

0234922

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ



5904253889

57-04

UAY

YAG

sala

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Microbiología y Parasitología

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ REGISTRO GENERAL SECCIÓN II	
29 ABR. 2004	
ENTRADA	SALIDA
Nº 983	Nº

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL
PROCESO DE DECOLORACIÓN DE UN EFLUENTE INDUSTRIAL
CON EL BASIDIOMICETO *Corioloopsis gallica***

TESIS DOCTORAL

Susana Yagüe Plaza

Alcalá de Henares, 2004



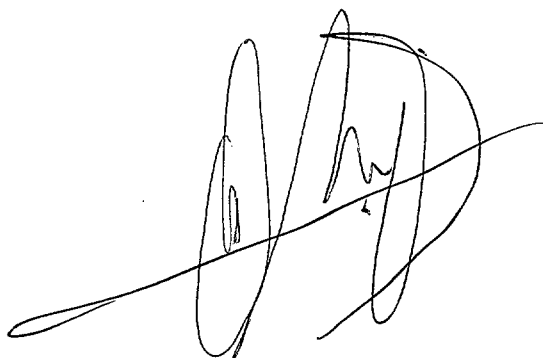
D

D. ALDO E. GONZÁLEZ BECERRA, Doctor en Biología e Investigador A3 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas con destino en el Centro de Investigaciones Biológicas en Madrid

CERTIFICA:

Que la licenciada SUSANA YAGÜE PLAZA ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Microbiología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas, el trabajo de investigación titulado "**Caracterización fisiológica y molecular del proceso de decoloración de un efluente industrial con el basidiomiceto *Corioloopsis gallica***", que presenta en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos firma el presente escrito en Madrid a 22 de Abril de 2004.



Fdo: Aldo E. González Becerra

VºBº

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



Fdo: Juan Soliveri de Carranza

VºBº

LA TUTORA



Fdo: Mª Enriqueta Arias Fernández

Esta tesis ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia (Beca predoctoral OPIS) y de los siguientes proyectos: Estudio de los mecanismos de bio-deslignificación mediante técnicas de cromatografía: Aspectos enzimáticos y moleculares. Programa de Cooperación CSIC-CNR 1995-1996. Oxidative enzymes for the pulp and paper industry (OXEPI). Ref: FAIR-CT95-0805(DG12-SSMA), 1995-1998, AIR Programme CE. Aspectos enzimáticos y moleculares de la degradación de polímeros aromáticos por hongos basidiomicetos. Referencia CICYT: BIO97-0655 (01.09.1997/01.09.2000).

Agradecimientos:

Quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la elaboración de este trabajo o me han brindado su apoyo de cualquier forma durante el tiempo de su realización. Discúlpennme aquellas que, por olvido involuntario, pueda omitir.

En primer lugar cuanto agradecer al Director de esta Tesis, Dr. Aldo González, por haberme recibido en su laboratorio aquel día en que llegue con mis levaduras bajo el brazo y por su apoyo en lo personal en todo momento.

A la empresa Mahou S.A. por haber hecho posible este trabajo de investigación y en especial a D. Carlos Sangrador y D. Francisco Martín, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y de sus conocimientos con respecto a la fabricación de la cerveza.

A mi Tutora, la Dra. María Enriqueta Arias y a la Dra. María Isabel Pérez-Leblic, por su apoyo y por estar siempre dispuestas a brindarme su ayuda. A los profesores y componentes de su departamento, y muy en especial a su secretaria: Soledad, por su constante preocupación y amabilidad para ayudarme a solucionar cualquier problema de papeleos.

A la Dra. María Fernández Lobato por haberme recibido en su laboratorio de la Universidad Autónoma y haberme ayudado en el trabajo de la expresión heteróloga, por su apoyo y colaboración en todo momento. A las chicas de su laboratorio, gracias por haberme acogido con tanto cariño.

Al Dr. Guido C. Galletti y Paola Bocchini por haberme recibido en la bonita Bologna y por haberme enseñado la técnica de Pi-CG-EM.

A los Dres. Manolo Espinosa, Gloria del Solar, Paloma López y Lucas Sanchez por abrirme siempre las puertas de su laboratorio y de su experiencia. Gracias a todos los componentes de sus laboratorios por su amabilidad y comprensión en todo momento.

A la generosidad del Dr. Gonzalo Almendros, siempre dispuesto a orientarnos con los análisis de IR y de Pi-CG-EM.

A la Dra. Mariana Mansur y la Dra. Ana M. Calvo por su ayuda y orientación en los inicios de mi primera etapa en el laboratorio.

A la Dra. Carmen Terrón, por su perseverancia en que hasta el más mínimo detalle de este trabajo estuviesen cuidados. Gracias, por que a pesar del poco tiempo que dispones has buscado un hueco para dedicarlo a la corrección de esta Tesis, pero sobre todo, mil gracias por tu constante apoyo, ánimos y por todo el cariño que he recibido de ti. Siempre te he sentido ahí, a mi lado. Perdóname Jorge por haberte robado a tu mamá en algunos momentos y gracias a ti también Juan.

A la Dra. Tania González, que decirte, tengo tanto que agradecerte, gracias por tu cariño, ánimos, por ser mi maestra en los experimentos de biología molecular y por tu ayuda en las correcciones de todo este trabajo. Mil gracias a Lisandro porque esta tesis lleva también un granito de su esfuerzo. Sólo decirlos, a ambos, lo mucho que me alegro de tener una hermana y un cuñado al otro lado del charco.

A los Dres. Ernesto Zapico, Ainhoa Arana, Alejandro Tellez, Ricardo Silva y Marco, y a Mery, Chema (mil gracias por tus correcciones), Howard y la recién incorporada María. Todos hemos formado una pequeña familia en el laboratorio, con sus más y sus menos, pero lo que a mí me queda son los buenos momentos que hemos vivido juntos, lo que hemos aprendido unos de otros y sobre todo la amistad que nos sigue y nos seguirá uniendo por muy lejos que estemos. Mil gracias a todos vosotros mis compañeros del laboratorio 405, conocerlos ha sido una muy bonita experiencia en mi vida.

A aquellos que me ayudaron y compartieron sus conocimientos conmigo aclarando mis muchas dudas. Gracias a Nandy, Pedro, Tatu, Edu, y Octavio (el "Mexicanito").

Gracias a todas aquellas personas de CIB que no teniendo que ver directamente con la investigación nos apoyan gentilmente para que salga adelante. Gracias a los servicios de fotografía, secuenciación, servicio técnico, esterilización, biblioteca, dirección y mil gracias al personal del comedor.

Finalmente quiero mostrar mi más sentido agradecimiento a toda mi familia en especial a mis padres y a mis suegros, por el apoyo, el cariño y la ayuda prestada cuidando de mis hijos mientras yo sacaba adelante este trabajo. Gracias a ti Manolo, por tu paciencia y comprensión en los peores momentos.

MUCHAS GRACIAS a todos.

*A Manolo y mis hijos,
Manuel y Alejandra,
por el tiempo que les he robado
hasta ver realizado este trabajo.*

*A mi familia, en especial
a mis padres y mis suegros,
por su paciencia, cariño
y apoyo cuidando de mis hijos
mientras yo terminaba esta tesis.*

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La cerveza	1
1.1.1. Etapas del proceso de fabricación de la cerveza	3
1.1.2. Efectos medioambientales derivados del proceso	6
1.1.3. Características del efluente objeto del estudio	7
1.1.4. Taninos	8
1.2. Los hongos	10
1.2.1. Los hongos de podredumbre blanca	11
1.2.2. Principales enzimas que intervienen en la degradación de la lignina	15
1.2.2.1. Enzimas ligninolíticas	15
1.2.2.2. Enzimas cooperantes	18
1.2.3. Estructura y función de las lacasas	19
1.2.4. Reacciones catalizadas por las lacasas	21
1.2.5. Genes que codifican para las lacasas y su regulación	23
1.2.6. Las lacasas y su potencial en aplicaciones biotecnológicas	25
1.2.6.1. Aplicación en procesos de bioblanqueo y bioblanqueo de la industria papelera	26
1.2.6.2. Aplicaciones en la industria alimentaria	26
1.2.6.3. Decoloración de efluentes industriales textiles	28
1.2.6.4. Otras aplicaciones de las lacasas	29
1.3. <i>Coriopsis gallica</i> y su aplicación en la degradación de efluentes de la industria cervecera	29
1.4. Expresión heteróloga de genes	30
1.4.1. Aspectos generales de la expresión heteróloga	30
1.4.2. Las levaduras como huéspedes de clonaje: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y otras levaduras	33
1.4.3. Expresión heteróloga de genes de lacasa	35
1.5. Objetivos del trabajo	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1. Efluente	39
2.1.1. Caracterización del efluente	39
2.1.1.1. Determinación del pH	39
2.1.1.2. Sólidos en suspensión	39
2.1.1.3. Determinación espectrofotométrica del color	39
2.1.1.4. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	40
2.1.1.5. Cuantificación de Fenoles	41
2.1.1.5.1. Fenoles totales	41
2.1.1.5.2. Taninos totales	41
2.1.1.5.3. Proantocianidinas	41
2.1.1.6. Condiciones óptimas de esterilización y pH	42
2.1.2. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)	42
2.1.3. Pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM)	42
2.2. Microorganismos y su mantenimiento	43
2.2.1. Hongos	43
2.2.2. Levaduras	43
2.2.3. Bacterias	44
2.3. Medios de cultivo	44
2.3.1. Medios de cultivo para hongos	44
2.3.1.1. Medio 7 o Czapek-Dox modificado	44
2.3.1.2. Medio Kirk	45
2.3.2. Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.3.2.1. Medio Completo (YEP)	45
2.3.2.2. Medio Mínimo de Levaduras (MML)	45
2.3.3. Medios de cultivo para bacterias	46
2.3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB)	46
2.3.3.2. Medio SOB	46

2.4. Cultivos de microorganismos.....	46
2.4.1. Cultivos de hongos.....	46
2.4.1.1. Ensayos cualitativos en placa.....	46
2.4.1.1.1. Degradación de colorantes poliméricos.....	47
2.4.1.1.2. Capacidad de oxidación del ácido tánico.....	47
2.4.1.1.3. Decoloración del efluente industrial.....	47
2.4.1.2. Cultivos líquidos.....	47
2.4.1.2.1. Preparación del inóculo.....	47
2.4.1.2.2. Condiciones generales de los cultivos.....	48
2.4.1.2.3. Cultivos suplementados con efluente.....	48
2.4.1.2.4. Preparación de cultivos con alta actividad lacasa.....	48
2.4.1.2.5. Análisis gravimétrico de polifenoles en los cultivos.....	48
2.4.1.2.6. Determinación del peso seco del micelio.....	49
2.4.2. Cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
2.4.2.1. Medios sólidos para la detección de la actividad lacasa.....	49
2.4.2.2. Medios líquidos para levaduras transformadas con el gen <i>cglcc1A</i>	49
2.4.3. Cultivos de bacterias.....	50
2.5. Determinaciones de actividades enzimáticas.....	50
2.5.1. Actividad lacasa.....	50
2.5.2. Actividad lignina-peroxidasa.....	51
2.5.3. Actividad manganeso-peroxidasa.....	51
2.6. Concentración de caldos enzimáticos.....	51
2.7. Zimogramas de actividad lacasa.....	51
2.8. Isoelectroenfoque (IFE).....	52
2.9. Decoloración del efluente con caldos enzimáticos.....	52
2.10. Técnicas de biología molecular.....	53
2.10.1. Obtención y purificación de ácidos nucleicos.....	53
2.10.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico de Hongos.....	53
2.10.1.2. Extracción y purificación de ARN total.....	53
2.10.1.2.1. Hongos.....	53
2.10.1.2.2. Levaduras.....	53
2.10.1.3. Extracción de ADN plasmídico.....	53
2.10.1.3.1. Bacterias.....	53
2.10.1.3.2. Levaduras.....	54
2.10.2. Purificación de fragmentos de ADN.....	54
2.10.3. Purificación de ARNm a partir de ARN total.....	54
2.10.4. Reacción de la transcriptasa reversa (RT).....	55
2.10.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
2.10.6. Clonaje de productos de PCR.....	56
2.10.7. Síntesis del ADNc del gen de lacasa <i>cglcc1</i>	56
2.10.8. Métodos de transformación.....	57
2.10.8.1. Transformación de bacterias.....	57
2.10.8.2. Transformación de levaduras.....	57
2.10.9. Secuenciación automática del ADN.....	58
2.10.10. Análisis de las secuencias de ADN.....	58
3. RESULTADOS.....	59
3.1. Caracterización del efluente de la industria cervecera.....	59
3.1.1. Caracterización preliminar del efluente.....	59
3.1.2. Condiciones óptimas de esterilización y pH.....	59
3.1.3. Análisis por espectroscopía de absorción infrarroja.....	60
3.1.4. Pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM).....	61
3.2. Estudios de decoloración del efluente con el basidiomiceto <i>Corioloropsis gallica</i>.....	64
3.2.1. Ensayos cualitativos de decoloración en medios sólidos.....	64
3.2.1.1. Comparación de la capacidad de crecimiento y decoloración del efluente con otros basidiomicetos, en diferentes medios de cultivo.....	64
3.2.1.2. Temperatura óptima de decoloración.....	67
3.2.1.3. Capacidad de crecimiento y decoloración en medios de cultivo con distintas concentraciones de efluente.....	68

3.2.1.4. Actividad ligninolítica en medios sólidos.....	72
3.2.1.4.1. Decoloración de colorantes poliméricos.....	72
3.2.1.4.2. Estudio de la producción de tanasa extracelular por <i>Coriopsis gallica</i>	73
3.2.1.5. Decoloración del efluente en medio Kirk con distintas fuentes de carbono.....	74
3.2.2. Estudios de decoloración en medios líquidos.....	76
3.2.2.1. Posible efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos del efluente sobre el crecimiento de <i>C. gallica</i>	76
3.2.2.2. Decoloración y disminución de la DQO en medio 7 con distintas concentraciones de efluente.....	77
3.2.2.3. Optimización de las condiciones de decoloración en medio Kirk	79
3.2.2.3.1. Decoloración del efluente en medio Kirk con distintas concentraciones de glucosa.....	79
3.2.2.3.2. Decoloración en medio Kirk con sorbosa como fuente de carbono.....	83
3.3. Expresión del gen <i>cglcc1</i> de <i>Coriopsis gallica</i> en condiciones de decoloración del efluente.....	87
3.4. Análisis de la degradación del efluente por pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM).....	89
3.5. Decoloración del efluente con caldos enzimáticos de <i>Coriopsis gallica</i>	93
3.6. Expresión heteróloga de un gen de lacasa de <i>Coriopsis gallica</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
3.6.1. Síntesis, clonaje y secuenciación del ADNc del gen <i>cglcc1</i> de <i>Coriopsis gallica</i>	95
3.6.2. Confirmación de la existencia de un nuevo gen de lacasa en <i>Coriopsis gallica</i>	96
3.6.2.1. Análisis del nuevo gen <i>cglcc1A</i> mediante PCR-RFLP.....	99
3.6.2.2. Caracterización de las secuencias de los ADNc de los genes <i>cglcc1</i> y <i>cglcc1A</i>	101
3.6.3. Clonaje del ADNc del gen <i>cglcc1A</i> de <i>Coriopsis gallica</i> en el vector de expresión pYES2...	103
3.6.4. Transformación en bacterias de la construcción pYES2 <i>cglcc1A</i> y verificación del clonaje.....	105
3.6.5. Transformación de la construcción pYES2 <i>cglcc1A</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
3.6.6. Análisis de expresión del gen <i>cglcc1A</i> , en las levaduras transformadas.....	108
3.6.7. Estudios de la actividad lacasa producida por las levaduras transformadas.....	110
3.6.7.1. Detección de la actividad lacasa en medio sólidos.....	110
3.6.7.2. Optimización de las condiciones de producción de la actividad lacasa.....	112
3.6.7.3. Estudios de la actividad enzimática de la proteína heteróloga en cultivos líquidos...	116
4. DISCUSIÓN.....	119
4.1. Potencial de <i>Coriopsis gallica</i> para la degradación del efluente de la industria cervecera.....	119
4.2. Posible efecto inhibitorio de los componentes fenólicos del efluente sobre el crecimiento de <i>C. gallica</i>	127
4.3. Importancia de la actividad lacasa en el tratamiento del efluente de la industria cervecera.....	130
4.4. El efluente de la industria cervecera como posible inductor de la actividad lacasa.....	133
4.5. El gen <i>cglcc1A</i> : ¿Un alelo de <i>cglcc1</i> ?.....	137
4.6. Expresión heteróloga del gen de lacasa <i>cglcc1A</i> de <i>Coriopsis gallica</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139
5. CONCLUSIONES.....	147
6. BIBLIOGRAFÍA.....	149

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

TABLAS:

	Pág.
Tabla 1: Valores aproximados de referencia para algunos parámetros de las aguas residuales en cervecerías (Arrieta y col., 1998).	6
Tabla 2: Genes de lacasa de hongos cuyas secuencias han sido publicadas.	24
Tabla 3: Genes de lacasa expresados de forma heteróloga y publicados hasta el momento (Enero, 2004).	36
Tabla 4: Asignaciones de las principales bandas de los espectros infrarrojos de la fracción precipitada con ácido del efluente, y de la fracción soluble.	60
Tabla 5: Productos de pirólisis de la fracción precipitada del efluente.	62
Tabla 6: Crecimiento de <i>Coriolopsis gallica</i> en medio 7 líquido en presencia de diferentes concentraciones de efluente, determinado gravimétricamente como Peso Seco de micelio, expresado en mg.	76
Tabla 7: Productos de pirólisis del tratamiento con <i>Coriolopsis gallica</i> de cultivos con distintas concentraciones de efluente.	90

FIGURAS:

	Pág.
Figura 1: Esquema del proceso de fabricación de cerveza	4
Figura 2: Ácido gálico y algunas estructuras de taninos.	9
Figura 3: Reacción típica de lacasa: oxidación de fenol.	22
Figura 4: Espectros infrarrojos (IR) de la fracción precipitada del efluente (A) y de la fracción correspondiente al sobrenadante del efluente (B).	60
Figura 5: Capacidad de crecimiento y decoloración de tres especies de basidiomicetos en medios sólidos control y suplementados con 20% de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.	65
Figura 6: Decoloración producida por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes</i> sp. I-62 y <i>Coriolopsis gallica</i> en medios sólidos suplementados con 20% de efluente. A: Control abiótico; B: Medio 7; C: Medio Kirk (sin alcohol veratrílico). Tiempo de incubación: 14 días para <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Trametes</i> sp. I-62, 8 días para <i>Coriolopsis gallica</i> . Temperatura de incubación: 28°C.	66
Figura 7: Diferencias en el crecimiento de <i>Coriolopsis gallica</i> en diferentes temperaturas de incubación. Tiempo de incubación: 8 días. A: Medio 7 control; B: Medio Kirk control; C: Medio 7 con 20% efluente; D: Medio Kirk con 20% efluente.	68
Figura 8: Capacidad de crecimiento y decoloración de <i>Coriolopsis gallica</i> en diferentes medios sólidos suplementados con distintas concentraciones de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.	69
Figura 9: Decoloración del efluente producida por <i>Coriolopsis gallica</i> en diferentes medios sólidos suplementados con distintas concentraciones de efluente. A: Medio 7; B: Medio Kirk; C: Medio Kirk con alcohol veratrílico.	71
Figura 10: Diferencia en el crecimiento de <i>Coriolopsis gallica</i> en distintos medios suplementados con 80 % de efluente. Tiempo de incubación: 20 días. A: Medio 7; B: Medio Kirk; C: Medio Kirk con alcohol veratrílico.	70
Figura 11: Capacidad de crecimiento de <i>Coriolopsis gallica</i> en medio Kirk sólido suplementado con colorantes poliméricos y 20 % de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.	72
Figura 12: Decoloración de los colorantes poliméricos Azul de Ramazol y Poly R-478, y del efluente por <i>Coriolopsis gallica</i> en cultivos en placa con medio Kirk.	73

Figura 13: Diferencias en el crecimiento de <i>Coriopsis gallica</i> en medio Kirk suplementado con Azul de Ramazol y efluente. Tiempo de incubación: 7 días. A: Medio Kirk con glucosa; B: Medio Kirk con fructosa; C: Medio Kirk con manosa; D: Medio Kirk con sorbosa.	75
Figura 14: Decoloración del efluente y Azul de Ramazol producida por el crecimiento de <i>Coriopsis gallica</i> en medio Kirk con distintas fuentes de carbono.	75
Figura 15: Decoloración (A) Disminución de DQO (B) y Peso Seco de la fracción precipitada con ácido (C) de las muestras de efluente tomadas en los diferentes días de tratamiento con el hongo <i>Coriopsis gallica</i> .	78
Figura 16: Actividad lacasa detectada en los cultivos de <i>C. gallica</i> en medio Kirk. Glucosa 1X: Kirk con glucosa (10g/l); Glucosa 5X: Kirk con glucosa (50g/l); SFC: Kirk sin fuente de carbono.	79
Figura 17: Actividad lacasa y porcentaje de decoloración de <i>C. gallica</i> en medio Kirk con 40% de efluente. Glucosa 1X: Kirk control con glucosa 10 g/l; Glucosa 5X: Kirk glucosa 50 g/l; SFC: Kirk sin fuente de carbono.	80
Figura 18: Diferencias en el tamaño y morfología de los agregados de micelio de <i>C. gallica</i> crecido en medio Kirk sin fuente de carbono control y con 40% de efluente.	81
Figura 19: Decoloración producida por <i>C. gallica</i> en medio Kirk con 40% de efluente y sin fuente de carbono. Los números indican los días de tratamiento con el hongo.	81
Figura 20: Zimogramas de actividad lacasa, en condiciones no desnaturalizantes, producida por <i>C. gallica</i> en los distintos días de la cinética, revelados con 2,6-dimetoxifenol. PM: peso molecular. SFC: sin fuente de carbono.	82
Figura 21: Actividad lacasa medida con 2,6-dimetoxifenol y porcentaje de decoloración del efluente en los cultivos de <i>C. gallica</i> en medio Kirk con sorbosa control y en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente (A). Niveles de actividad lacasa detectados en diferentes días de cultivo en medio Kirk con sorbosa suplementado con efluente y variación de la decoloración del efluente en esos mismos días (B). Análisis de regresión de los valores de actividad lacasa y la variación de la decoloración del efluente (C).	84
Figura 22: Decoloración del efluente producida por <i>C. gallica</i> en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. Los números indican los días de tratamiento con el hongo.	85
Figura 23: Zimograma de actividad lacasa, en condiciones no desnaturalizantes y revelados con 2,6-dimetoxifenol, producida por <i>C. gallica</i> en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. PM: marcador de peso molecular (A). Isoelectroenfoque de las bandas más intensas detectadas en los días 5 y 7 del zimograma. a: bandas de mayor peso molecular. b: bandas de menor peso molecular (B).	86
Figura 24: Diferencias en el tamaño y la morfología de los agregados de micelio de <i>Coriopsis gallica</i> crecido en medio Kirk sorbosa control y con efluente.	86
Figura 25: Cebadores utilizados en los estudios de expresión del gen <i>cglcc1</i> de <i>C. gallica</i> . El diseño se realizó a partir de la secuencia del ADNc de este gen.	87
Figura 26: Efecto de la adición de efluente de la industria cervecera sobre la actividad lacasa (A) y los niveles de transcritos del gen <i>cglcc1</i> de <i>Coriopsis gallica</i> (B) en cultivos del hongo en medio Kirk con sorbosa (control) y medio Kirk con sorbosa y 40 % de efluente. Se tomaron muestras de medio de cultivo y micelio en diferentes días de la cinética. <i>lcc</i> : Amplificación con cebadores internos específicos para gen de lacasa <i>cglcc1</i> ; <i>gpd1</i> : Amplificación con los cebadores específicos para un fragmento del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (<i>gpd1</i>).	88
Figura 27: Cantidades relativas de transcritos del gen <i>cglcc1</i> y porcentaje de decoloración en diferentes días del cultivo de <i>C. gallica</i> en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. Los cálculos se realizaron mediante cuantificación densitométrica de los correspondientes productos de PCR. Las unidades arbitrarias expresan la proporción entre las cantidades de transcritos del gen <i>cglcc1</i> y las del gen que codifican para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>gpd1</i>), es decir: $\text{lacasa}/(\text{GPD1}_{\text{muestra}}/\text{GPD1}_{\text{media}})$.	89
Figura 28: Pirogramas de las muestras V ₁ , conteniendo 20% de efluente, antes (a) y después de 12 días de tratamiento con <i>Coriopsis gallica</i> (b). La designación de los picos se muestra en	91

la Tabla 6.

- Figura 29:** Decoloración del efluente con caldo enzimático de *Corioloopsis gallica* obtenido a partir de cultivos con alta actividad lacasa. Se comparan las unidades de color (UC) en la mezcla con enzima de dos muestras (A y B) y en el control. Se muestra además el cambio en los valores de actividad lacasa en las mezclas con enzima (A y B) durante el tiempo de incubación. 94
- Figura 30:** Cambios en el espectro visible de absorción, en el primer día del experimento, debidos al tratamiento del efluente con caldo enzimático de *Corioloopsis gallica* obtenidos a partir de cultivos con alta actividad lacasa. 94
- Figura 31:** Amplificación por PCR del ADNc del gen *cglcc1* de *Corioloopsis gallica*. MX: Marcador de peso molecular. A y B: Resultado de las reacciones de amplificación a partir de dos muestras diferentes. 96
- Figura 32:** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del ADN genómico correspondiente al gen *cglcc1* de *Corioloopsis gallica* (representado en la línea superior), y el ADN complementario, sintetizado por RT-PCR (representado en la línea inferior). En minúsculas aparecen las secuencias que codifican para intrones. 97
- Figura 33:** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del ADN complementario del gen *cglcc1* de *Corioloopsis gallica* (en letras minúsculas) y de otro ADNc (*cglcc1A*) aislado por RT-PCR utilizando los mismos cebadores (en letras mayúsculas). En color amarillo se resaltan las diferencias en los nucleótidos de ambos ADNc. 98
- Figura 34:** Estrategia para la confirmación de la existencia de un nuevo gen de lacasa (*cglcc1A*) en *Corioloopsis gallica*. El análisis se basa en la pérdida en este gen de uno de los sitios de reconocimiento para *Sac* I (1490 pb), detectada en la secuencia del ADN complementario clonado. 99
- Figura 35:** Análisis de la posible existencia de un nuevo gen de lacasa de *Corioloopsis gallica*. A: Digestión con *Sac* I del producto de la amplificación por PCR, a partir de ADN genómico total, utilizando los cebadores específicos para el gen *cglcc1*. Se obtienen dos bandas correspondientes al corte del gen *cglcc1* en el sitio *Sac* I (localizado a 1490 pb) y una banda de mayor tamaño (2240 pb) que demuestra la pérdida del sitio de corte para esta enzima en el nuevo gen. B: En el análisis de restricción con *Sac* I de varios clones obtenidos al clonar los productos amplificados se aprecia que una de las muestras (la señalada con flecha) tiene el patrón característico de la pérdida del sitio *Sac* I. Se seleccionó este clon para ser secuenciado y analizar si correspondía a un nuevo gen de lacasa. MX: Marcador de peso molecular. 100
- Figura 36:** Comparación de las proteínas deducidas a partir de las secuencias de ADNc del gen *cglcc1* (línea inferior) y del ADNc del gen *cglcc1A* (línea superior) de *Corioloopsis gallica* (Identidad: 99,2%). En azul se muestra el péptido señal, en verde los sitios potenciales de glicosilación, en rojo los sitios de unión a cobre, en morado las cisteínas y, remarcados en amarillo las diferencias detectadas en los aminoácidos de las proteínas. 102
- Figura 37:** Representación esquemática del clonaje del ADNc del gen *cglcc1A* de lacasa de *Corioloopsis gallica* en el vector de expresión pYES2. Clonaje en *Bam* HI. ADNc con extremos *Bgl* II. 104
- Figura 38:** Representación esquemática de los fragmentos teóricos producidos por las digestiones con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Bgl* I y la doble digestión *Bam* HI-*Bgl* I, del vector pYES2 (A) y el pYES2*cglcc1A* (B). 105
- Figura 39:** Electroforesis, en gel de agarosa al 1%, de los diferentes fragmentos generados en las distintas digestiones con enzimas de restricción del vector de expresión pYES2 y pYES*cglcc1A*. MX: Marcador de peso molecular. 106
- Figura 40:** Electroforesis en gel de Agarosa 1% de los ARNs extraídos de las Levaduras transformadas. (Lt: levadura transformada; Ltc: levadura transformada control) 108
- Figura 41:** Electroforesis en gel de Agarosa 1% del fragmento generado en la reacción de RT-PCR de las muestras de ARN de las levaduras transformadas. MX: Marcador de peso molecular. 109
- Figura 42:** Electroforesis en gel de Agarosa 1% de los fragmentos obtenidos en la reacción de 109

RT-PCR, de las muestras de ARN de las levaduras transformadas crecidas en medios con glucosa. MX: Marcador de peso molecular. gal:galactosa. Ckit: control interno del kit de RT-PCR.

- Figura 43:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa (A) y glucosa (B), ABTS 10 mM y CuSO₄ 0,1 mM. Tiempo de incubación: 10 días. 111
- Figura 44:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa (A) y glucosa (B), 2,6-dimetoxifenol 10 mM y CuSO₄ 0,1 mM. Tiempo de incubación: 10 días. 111
- Figura 45:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa en A y galactosa/manosa (75%/25%) en B, ABTS 10 mM, CuSO₄ 0,1 mM. 5 días de incubación. 112
- Figura 46:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa en A y galactosa/manosa (75%/25%) en B, ABTS 0,2 mM, CuSO₄ 0,1 mM. 5 días de incubación. 113
- Figura 47:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa, ABTS 10 mM y diferentes concentraciones de CuSO₄ (A: 0,1 mM; B: 0,4 mM; C: 0,8 mM). 8 días de incubación. 114
- Figura 48:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa y manosa (75%/25%), ABTS 10 mM y diferentes concentraciones de CuSO₄ (A: 0,1 mM; B: 0,4 mM; C: 0,8 mM). 5 días de incubación. 115
- Figura 49:** Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placa con medio mínimo URA⁻, con galactosa (75%) y manosa (25%), ABTS 10 mM y CuSO₄ 0,4 mM. 5 días de incubación. 115
- Figura 50:** Ensayo de actividad lacasa de las levaduras transformadas con el gen de lacasa de *C. gallica* (L18 AyB) en mezclas con caldo enzimático y ABTS (10 mM). C4 AyB: levaduras transformadas control. 117

Las industrias papeleras, textiles, de elaboración de aceite, destilerías, cerveceras, etc, que utilizan materiales vegetales como materia prima, producen efluentes que suelen contener en su composición altas proporciones de sustancias polifenólicas. Este tipo de efluentes no son depurados fácilmente con los métodos convencionales, tanto aerobios como anaerobios, debido principalmente a la actividad antimicrobiana que presentan los compuestos fenólicos. Esto hace que se impida la proliferación adecuada de los microorganismos que han de llevar a cabo el tratamiento de depuración.

La producción de cerveza es llevada a cabo mediante la fermentación, mediada por levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) usando granos de cebada como materia prima. El líquido fermentado se hace pasar a través de filtros de polivinilpolipirrolidona (PVPP), que retienen los compuestos polifenólicos presentes en la cerveza. De esta manera se consigue reducirlos y se obtiene una cerveza final clara y sin turbidez. Para eliminar los polifenoles adheridos al PVPP se hace un lavado de los filtros con una solución de sosa, de manera que se obtiene un efluente alcalino (que será el utilizado en este estudio) de color marrón oscuro y una alta concentración de polifenoles (principalmente taninos).

Los polifenoles presentes en este efluente pueden causar un gran impacto medioambiental cuando son vertidos, junto con los efluentes finales, a las aguas fluviales. Los tratamientos convencionales de depuración consiguen reducir las demandas química y biológica de oxígeno del efluente final, pero no eliminan su color oscuro. El color de los efluentes supone, en sí mismo, una contaminación de las aguas de los ríos, pues impide el paso de la luz y por tanto la fotosíntesis y la oxigenación causando problemas a la vida acuática. Por ello, resulta de interés continuar la investigación para el desarrollo de tecnologías más efectivas en el tratamiento de este tipo de efluentes.

Después de la lignina, los taninos son el segundo grupo de polifenoles más abundante en las plantas. Tanto la lignina como los taninos comparten características estructurales similares. Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca son capaces de secretar sistemas enzimáticos complejos que degradan la lignina hasta compuestos de bajo peso molecular. La probada capacidad de los hongos basidiomicetos para degradar compuestos polifenólicos tiene un gran potencial en la decoloración y disminución del impacto ambiental de efluentes procedentes de industrias que utilizan materias primas vegetales en sus procesos. El estudio de las enzimas degradativas de la

lignina se orienta principalmente al grupo de las fenoloxidasas (lacasas) y peroxidasas (lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) que constituyen familias de isoenzimas que han demostrado ser altamente eficientes en el proceso de degradación de este biopolímero y de otras moléculas fenólicas naturales o sintéticas relacionadas estructuralmente con él.

Coriolopsis gallica, pertenece al grupo de basidiomicetos de podredumbre blanca y ha sido seleccionado para el presente trabajo por su capacidad de degradar efluentes de distinta procedencia como los de la industria papelera y textil. La lacasa ha sido descrita como la principal, y hasta la fecha, la única enzima ligninolítica de este hongo. Las lacasas son fenoloxidasas con una baja especificidad de sustrato lo que les permite degradar un amplio rango de compuestos polifenólicos.

El presente trabajo consta de tres partes fundamentales. En la primera, se realizó una caracterización del efluente procedente de la industria cervecera y se analizó la capacidad de crecimiento y degradación de *C. gallica* sobre el mismo, con el objetivo final de aplicar este hongo *in vitro* en el tratamiento de este tipo de efluentes, o de aquellos que muestren características similares. En la segunda parte, y una vez probada la capacidad de crecimiento del hongo en el efluente, se optimizaron las condiciones de cultivo para la degradación del efluente y se estudiaron los mecanismos involucrados en el proceso degradativo con especial énfasis en la maquinaria enzimática responsable del mismo, así como el aspecto molecular de la producción de lacasa por este basidiomiceto. De esta forma se estudió la expresión génica del gen de lacasa en condiciones de alta decoloración y la capacidad de esta enzima de decolorar el efluente *in vitro*, utilizando caldos enzimáticos con alta actividad lacasa. La tercera etapa del trabajo consistió en la puesta a punto de un sistema de expresión heterólogo del gen de lacasa de *C. gallica* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como una herramienta necesaria para expresar el gen de interés en forma heteróloga, obteniendo proteínas activas con gran potencial en usos industriales.

1.1. La cerveza.

Según la mitología egipcia, fue Osiris, Dios de la agricultura, quien enseñó a la humanidad el arte de fabricar cerveza (Bamforth, 2000). La cerveza egipcia se producía enterrando cebada en recipientes de germinación en los que la papilla formada fermentaba por la acción de levaduras salvajes. La adición del lúpulo, que da el amargor a la cerveza, se cree que procede del siglo VII a.C. La fabricación de cerveza estaba extendida por el norte de Europa ya a comienzos de la era cristiana, y hoy casi todos los países industrializados de Asia y América tienen industrias cerveceras. Los principales países productores de cerveza en la actualidad son Estados Unidos, Alemania, Rusia, Reino Unido, Japón y México.

Se dice que la cerveza fue introducida en España, un país tradicionalmente vinícola, por Carlos V en el siglo XVI. Tras su abdicación, el emperador instaló una pequeña fábrica de esta bebida en el monasterio de Yuste, al que le había acompañado un maestro cervecero. A partir de entonces, el consumo de cerveza en nuestro país evoluciona lenta y positivamente y en torno a 1900 aparecen las grandes compañías cerveceras españolas: Mahou (1890), Aguila (1900), Cruz Campo (1904) y Damm (1910).

Actualmente, en España, hay alrededor de 10 compañías cerveceras que cuentan con un total de unas 22 fábricas distribuidas por toda la geografía española. La mayoría de estas empresas cerveceras están asociadas a compañías multinacionales y la mayor parte de ellas cuentan con una acreditación de calidad y se encuentran en proceso de obtener la acreditación medioambiental, que alguna de ellas ya posee. El nivel tecnológico medio del sector es alto, demostrando un gran interés por aquellas innovaciones y mejoras aplicables.

La producción de cerveza en España durante el año 2001, y según datos de la asociación Cerveceros de España (2002), fue de alrededor de 27,7 millones de hectolitros. España se consolida con su crecimiento sostenido como el tercer productor de cerveza de la Unión Europea, sólo por detrás de Alemania y del Reino Unido; como el primer productor de cerveza del sur de Europa por delante de Francia e Italia, y como el noveno del mundo.

Según la reglamentación Técnico-Sanitaria Española, *"la cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión*

enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La malta puede ser sustituida por malta de cereales, granos crudos que contengan féculas, así como azúcares, siempre que las sustancias añadidas no excedan del 50% en masa de la materia prima utilizada".

Tras esta definición tan técnica, la cerveza desde un punto de vista nutritivo puede considerarse como una mezcla de alimento y bebida que, fundamentalmente, se bebe por placer. En la cerveza, la buena calidad de cada uno de sus ingredientes (agua, cebada, lúpulo y levadura) es indispensable para la obtención de un buen producto final.

El agua es un elemento esencial en su elaboración, por lo que ha de ser pura, potable, estéril, libre de sabores y olores extraños. Según su composición, tiene gran influencia en las características organolépticas de la cerveza: de forma natural, el agua contiene una serie de sales que influyen de forma definitiva en su calidad. A la hora de elaborar la cerveza, los minerales más importantes contenidos en el agua son el calcio, que influye en la turbidez y el color, los sulfatos, que influyen en el amargor, y los cloruros, que afectan a la textura de la bebida.

La cebada (*Hordeum vulgare*) es el cereal que facilita el malteado. Su denominación procede del aragonés, pero en castellano se utiliza también el término "hordio", del vocablo latín "hórdeum". Las cualidades de la cebada empleada en la obtención de la malta ejercen un papel fundamental en la elaboración de la cerveza. Además de la cebada, en la fabricación de la cerveza se utilizan otro tipo de materias primas vegetales como son los llamados adjuntos o sucedáneos sólidos y líquidos. Los sucedáneos sólidos más utilizados son las sémolas de maíz y arroz. También pueden utilizarse granos de sorgo y de trigo. Entre los sucedáneos líquidos son empleados azúcares o jarabes de cereales, o extractos de algas marinas rojas o pardas.

El sabor amargo tan característico de la cerveza es debido al **lúpulo** (*Humulus lupulus*), una planta trepadora del género de las Cannabinaceas, originaria de Japón. Hoy en día resulta sorprendente imaginar una cerveza sin amargor, pero hasta que empezó a utilizarse el lúpulo la cerveza era dulzona y espesa. Las flores femeninas del lúpulo (también llamadas conos o piñas) contienen en su interior unas glándulas de color amarillo, llenas de una resina llamada lupulina, que es el principio activo que los cerveceros buscan en el lúpulo. La lupulina aporta componentes amargos que dotan a la cerveza de su característico amargor, contribuyen a la formación de espuma y ayudan a la conservación de la cerveza. Además contiene componentes aromáticos que incorporan aroma y sabor a la cerveza.

La **levadura** utilizada para la fermentación del mosto también influye de manera decisiva en las cualidades organolépticas del producto terminado. Fundamentalmente, la levadura transforma

los azúcares que contiene el mosto de cerveza en alcohol y gas carbónico. Para su desarrollo, la levadura utiliza otros nutrientes presentes en el mosto que son transformados y que son responsables del cambio organoléptico que se opera en la cerveza.

1.1.1. Etapas del proceso de fabricación de la cerveza.

En la actualidad, el proceso de elaboración de la cerveza emplea una avanzada tecnología con objeto de mejorar la calidad y la seguridad del producto final. La tradición de las primeras recetas con las que, hace miles de años, las antiguas civilizaciones elaboraban la cerveza, en cierto modo se conservan. En la figura 1 se esquematizan las principales etapas en la fabricación de esta bebida.

En primer lugar, se prepara la malta que es "el espíritu de la cerveza". Se obtiene por remojo, germinación y posterior secado y tostado de los granos de cebada, y contiene todos los elementos necesarios para el desarrollo de la levadura. Después de varias semanas de reposo, la malta se muele y se mezcla con agua caliente en una caldera, a temperaturas sucesivas de 45, 62 y 72°C en lo que se llama empastado. Estas temperaturas provocan que los almidones contenidos en la malta se transformen en azúcares (Hough, 1990). Este proceso se realiza en las malterías o en las mismas instalaciones de la cervecera. La malta se recibe a granel, se pesa y se dirige a la zona de silos donde se descarga.

El mosto de malta es el líquido obtenido por tratamiento de malta con agua para obtener sus principios solubles. Las etapas que comprende el proceso de elaboración del mosto son: molienda, maceración, filtración, cocción, clarificación y enfriamiento (Fig. 1).

La molienda tiene por objeto triturar la malta para lograr un tamaño de partícula que permita una maceración adecuada. La harina de malta se mezcla con agua y se vierte en cubas, donde se produce la maceración, consiguiendo que el almidón se transforme en azúcares fermentables y las proteínas en péptidos y aminoácidos, que constituirán la fuente nitrogenada necesaria para la fermentación posterior. Al final del proceso, la mezcla se somete a filtración, mediante una cuba filtro o filtro prensa, contribuyendo la propia cascarilla de la malta a formar un lecho filtrante. En esta etapa se separa el mosto del bagazo (restos sólidos de la maceración). El jugo obtenido de la filtración se introduce en una caldera donde se calienta junto con el lúpulo hasta ebullición, con lo que se extraen las sustancias amargas del lúpulo, se elimina el exceso de agua consiguiendo una densidad adecuada del mosto, se esteriliza el mosto y se precipitan los complejos de proteínas.

Para la clarificación del mosto se utilizan unos grandes depósitos llamados "Whirlpool", en donde se eliminan estos precipitados de proteínas, mediante un tipo especial de centrifugación. El último paso antes de la fermentación es el enfriamiento del mosto.

Al mosto obtenido se le inyecta aire estéril. En este momento ya está listo para la fermentación que comprende las siguientes operaciones: fermentación, eliminación de las levaduras y maduración o guarda.

El mosto frío se introduce en grandes depósitos a los que se añaden las levaduras, previamente preparadas, que crecen hasta agotar el oxígeno y fermentar los azúcares, transformándolos en alcohol y anhídrido carbónico (CO_2). Dado que ésta reacción es exotérmica, los depósitos de fermentación se refrigeran para mantener una temperatura adecuada, según el tipo de cerveza.

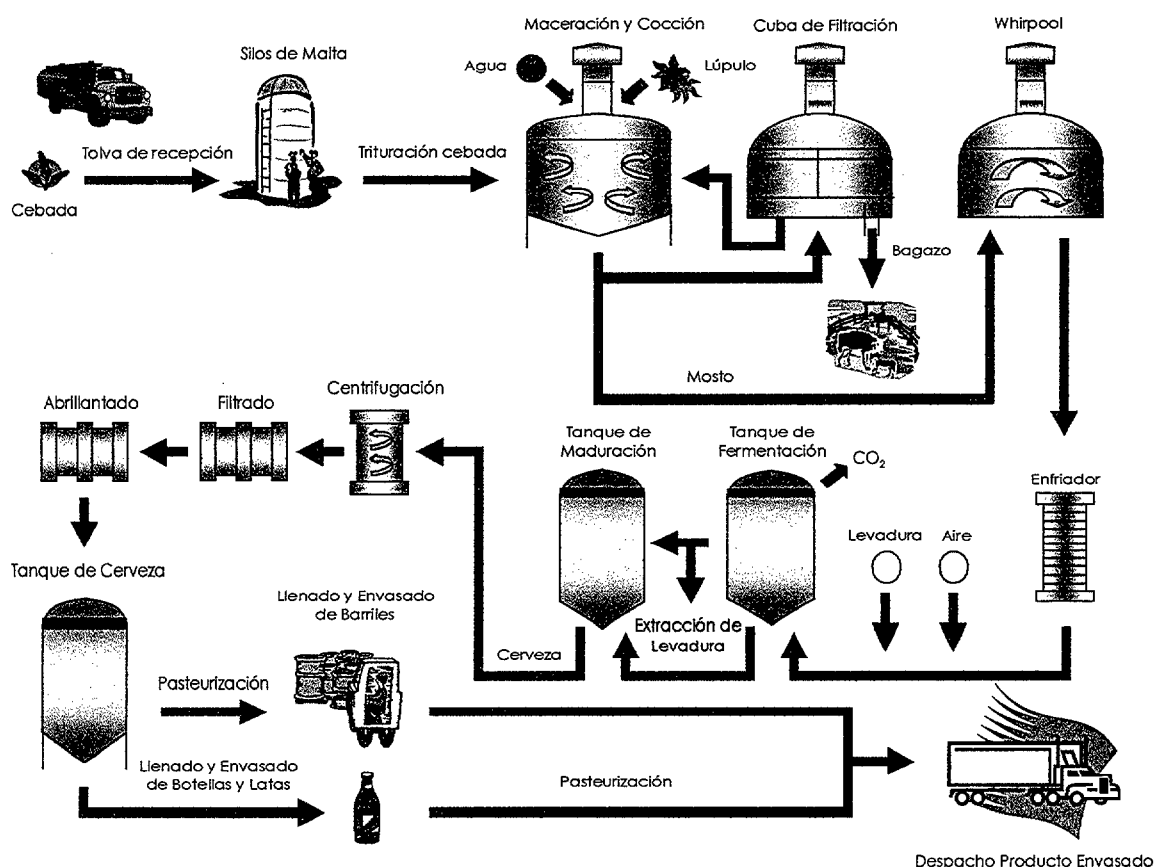


Figura 1: Esquema del proceso de fabricación de cerveza

Una vez terminada la fermentación primaria, se realiza la extracción de la levadura reutilizando una parte, para sucesivos procesos de elaboración, y el resto de la levadura es eliminada como residuo.

Tras la fermentación, la cerveza pasa a grandes recipientes o tanques de guarda, a temperaturas de 0 a 5° C. Es ahí donde se produce la fermentación lenta, llamada también guarda o fermentación secundaria, en la que la cerveza adquiere el sabor y aroma definitivo. Dependiendo del tiempo de

permanencia en las bodegas de guarda, se obtiene un tipo u otro de cerveza, que puede ser más o menos fina. Las operaciones finales del proceso de fabricación de cerveza son: centrifugación, filtrado y abrillantado, pasteurización, carbonatación y envasado (Fig. 1).

La cerveza madura se puede centrifugar antes del filtrado para eliminar la levadura restante y los precipitados. Esta operación se realiza o no dependiendo del tipo de lúpulo añadido y la levadura empleada, obteniéndose buenos rendimientos para levaduras que floculan bien. La filtración se realiza con tierra de diatomeas o "Kieselguhr", con las que se hace una precapa a través de la cual pasa la cerveza. El abrillantado o estabilización coloidal de la cerveza puede hacerse mediante placas filtrantes, que están constituidas por fibras de celulosa, o mediante microfiltración tangencial, utilizando filtros de silicagel o de polivinilpolipirrolidona (PVPP) donde quedan retenidos los coloides de la cerveza y proteínas.

La cerveza filtrada y abrillantada, se introduce en un depósito regulador presurizado que sirve de alimentador para el pasteurizador. El depósito y toda la línea hasta la llenadora deben estar bajo presión para que no se pierda el carbónico. Si la cerveza no tuviera suficiente carbónico se le inyecta en este momento.

La estabilización microbiológica se realiza generalmente mediante pasteurización aunque existen tecnologías de membrana que permiten realizar esta operación sin necesidad de aplicación de calor. El tratamiento térmico se mide en unidades de pasteurización (PU), que equivalen a un minuto de tratamiento a 60°C. La estabilización microbiológica asegura que la cerveza mantenga sus propiedades por un periodo de tiempo suficientemente largo. La cerveza se puede estabilizar antes o después del envasado dependiendo del tipo de envase que se vaya a usar. Así, la cerveza que va a ser envasada en barriles se pasteuriza antes del llenado, debido al volumen de los barriles, mientras que las latas o botellas son pasteurizadas después de su llenado.

El envasado puede ser en botellas, retornables o de un solo uso, en latas o en barriles. Las líneas de envasado son distintas según el tipo de envases.

En Europa, las cervezas varían mucho en sabor, color y fuerza, y cada fase del proceso de elaboración es susceptible de alteraciones, modificaciones e intervenciones creativas. Con todo, hay una distinción básica en la familia de las cervezas: el tipo de levadura. Las cervezas elaboradas con levaduras flotantes (es decir, aquellas que flotan en la superficie del mosto en la fermentación) reciben el nombre de tipo "ale"; las cervezas que se elaboran con levaduras que fermentan en el fondo del fermentador reciben el nombre de tipo "lager".

1.1.2. Efectos medioambientales derivados del proceso.

Los principales efectos medioambientales de las industrias del sector cervecero, se localizan en unas pocas operaciones básicas que son comunes a la mayoría de los procesos (Crous, 1994). Dichos efectos pueden resumirse en:

Consumo de agua: Este tipo de industrias consume grandes volúmenes de agua, fundamentalmente en las operaciones de limpieza de equipos e instalaciones y en el proceso de envasado. También es importante el agua que se incorpora al producto (el 95% del peso de la cerveza es agua que se añade durante el proceso de elaboración). Los consumos de agua pueden oscilar entre 6 y 10 HI de agua/HI cerveza (Gil, 1995).

Consumo de energía: Los procesos energéticos relacionados con el proceso de elaboración de cerveza, se producen en forma de calor, vapor, agua caliente y electricidad (Crous, 1994). La repercusión de la energía en los costes de fabricación se sitúa como promedio en torno al 5%. Este consumo se reparte en 75% de energía térmica y 25% de energía eléctrica (Informes IDAE, 1997).

Vertido de aguas residuales: En la industria cervecera se produce un gran volumen de aguas residuales, especialmente en operaciones de limpieza y envasado. El vertido puede representar el 65-80% del total del agua consumida (van Oeveren, 1993). Estas aguas presentan una carga orgánica elevada, sólidos en suspensión y vertidos puntuales de limpieza y vaciado de los baños de la lavadora de botellas con pH fuertemente alcalinos (Gil, 1995).

Tabla 1: Valores aproximados de referencia para algunos parámetros de las aguas residuales en cervecerías (Arrieta y col., 1998).	
Parámetros	Valores aproximados
Agua Consumida	6-10 HI agua/HI cerveza
Agua Residual	65-80% agua consumida
DBO específica	0,8 Kg DBO/HI cerveza
DBO efluente	1200-1800 mg/l
DQO efluente	1900-2500 mg/l
Relación DBO/DQO	0,65
Sólidos en suspensión	1000 mg/l

En la tabla 1, se muestran algunos rangos típicos de estas aguas residuales. Las concentraciones de contaminantes dependen del consumo específico de agua o ratio vertido/producción, de las

pérdidas que tienen lugar durante la fabricación, el destino de los subproductos o residuos, y del tipo de reactivos químicos empleados (Perry, 1997). En general, las características de aguas residuales generadas hacen necesario su tratamiento previo al vertido a la red de alcantarillado o a un cauce natural, ya que algunos parámetros del vertido, suelen presentar valores por encima de los permitidos en la normativa vigente (Gil, 1995; Arrieta y col., 1998).

Residuos sólidos: La mayor parte de los residuos sólidos generados en las cervecerías son de carácter orgánico (bagazos, levaduras y fangos de depuradora), que pueden ser considerados como subproductos ya que tienen valor como materia prima para otras industrias (alimentación humana, alimentación animal, industria farmacéutica). También se generan elevadas cantidades de residuos de envase (vidrio, cartón, plásticos, restos metálicos) derivados de las operaciones de recepción de materia prima y envasado.

Emisiones a la atmósfera: Las emisiones que se pueden producir en este tipo de actividad son: gases de combustión, polvo originado en las operaciones con la malta, vahos de vapor de agua, compuestos volátiles durante la cocción, la fermentación y maduración de la cerveza, CO₂ y fugas eventuales de fluido refrigerante.

Olores: El olor característico de las cervecerías se produce en las fases de cocción y fermentación del mosto o en la depuradora de aguas residuales.

Ruido: Pueden presentarse problemas con el ruido en algunas operaciones como son el envasado, la generación de frío o el tráfico de camiones.

1.1.3. Características del efluente objeto del estudio.

El efluente objeto de este estudio procede de la regeneración, con NaOH, de los filtros de polivinilpolipirrolidona (PVPP) utilizados para la clarificación de la cerveza en el proceso de abrillantado o estabilización coloidal de la misma, en los cuales quedan retenidos los polifenoles y proteínas de la cerveza. Si bien este efluente supone aproximadamente un 1% de efluente que llega a la depuradora, representa un gran problema de tratamiento por su alta carga orgánica y pH altamente alcalino. Generalmente, los residuos líquidos resultantes de los lavados de estos filtros, son almacenados en tanques y dosificados hacia las depuradoras lentamente, diluyéndolos o descargados cuando se prevé que va a haber una descarga ácida.

Sin un apropiado tratamiento de estabilización, la mayoría de las elaboraciones convencionales de cerveza tienden a desarrollar velos coloidales insolubles que se forman, en gran medida, durante el periodo de fermentación en frío y almacenamiento (Howard, 1980). Estos velos se producen al

polimerizar compuestos polifenólicos presentes en la cebada, la malta, el lúpulo, el mosto y la cerveza (Harris, 1956, 1965; Sogawa, 1973; Eastmond, 1974; Laws y col., 1976; Gardner y McGuinness, 1977; Kirby y col., 1977; McMurrough y col 1983; Wettstein, 1993). Por este motivo, los polifenoles son generalmente considerados compuestos indeseables y son, por tanto, frecuentemente eliminados durante la clarificación de la cerveza mediante la utilización de filtros de polivinilpolipirrolidona antes del envasado (Makkar y col., 1993; Maillard y col., 1996).

Por otra parte, los polifenoles presentes en el efluente pueden causar un gran impacto medioambiental cuando son vertidos, junto con los efluentes finales, a las aguas fluviales (Dipple y col., 1990). Las elevadas demandas química y biológica de oxígeno son reducidas mediante los tratamientos convencionales de las aguas residuales, como lagunas de oxidación y plantas de fangos activados, que no son efectivos en la eliminación del color de los polifenoles o de compuestos aromáticos complejos. El color de los efluentes es, en sí mismo, una contaminación de las aguas de los ríos, pues impide el paso de la luz y por tanto la fotosíntesis y la oxigenación causando problemas a la vida acuática. Por ello es necesario buscar una alternativa biotecnológica que permita reducir o eliminar el alto contenido polifenólico de estos residuos de la industria cervecera.

1.1.4. Taninos.

El número de las diferentes especies químicas, que se agrupan y clasifican bajo el término general de taninos, es elevadísimo. Para el cervecero sólo tienen interés los que están presentes durante el proceso de elaboración de la cerveza, sobre todo y preferentemente, aquellos que permanecen solubles, bien sea en forma libre, combinada o transformada, como activos componentes de la misma y responsables en buena parte, por un lado de su propio "carácter" y por otro, de estar directamente implicados en su estabilidad coloidal (Ros, 1998). Estos compuestos proceden de las materias primas utilizadas en el proceso: cebada, malta y lúpulo.

Los taninos suelen definirse como polímeros fenólicos solubles en agua que precipitan con proteínas (Haslam, 1989). Sin embargo, muchos fenoles solubles que tienen propiedades análogas estructurales y químicas a los taninos no precipitan proteínas. Hay también fenoles de alto peso molecular que tienen estructuras parecidas a los de taninos pero que no son solubles en agua (Bate-Smith, 1973; Stafford y Cheng, 1980). De acuerdo con lo anterior, la definición que se basa únicamente en la capacidad de los polifenoles para precipitar proteínas es demasiado restrictiva. Horvath (1981) desarrolló una definición más amplia: "cualquier compuesto fenólico de peso molecular suficientemente alto, que contiene suficientes grupos fenólicos hidroxilos y otros grupos apropiados (es decir, carboxilos) para formar efectivamente fuertes complejos con proteínas y otras macromoléculas, en las condiciones ambientales particulares en las que han sido estudiadas". La

capacidad de formar complejos con minerales podría ser también agregada a esta definición, teniendo en cuenta que los taninos pueden formar complejos con el almidón y la celulosa, así como también con proteínas. Los taninos existen en mezclas con muchas otras clases de compuestos fenólicos de plantas.

Se subdividen comúnmente en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas. Los taninos hidrolizables están formados por monosacáridos esterificados en varias posiciones, con ácido gálico (Fig. 2) y elágico entre otros (William y col., 1986). El tanino hidrolizable más abundante en la naturaleza es el ácido tánico (Fig. 2), formado por una molécula de glucosa esterificada con un número variable de moléculas de ácido gálico. Además, las moléculas de ácido gálico también se unen entre sí, a través de uniones depsídicas, originando no una única molécula, sino todo un conjunto de estructuras relacionadas, con un mayor o menor número de sustituciones. Los taninos condensados o proantocianidinas están formados por la unión de unidades flavonoides, siendo las más frecuentes la catequina (Fig. 2), la epicatequina, la rutina, y la morina.

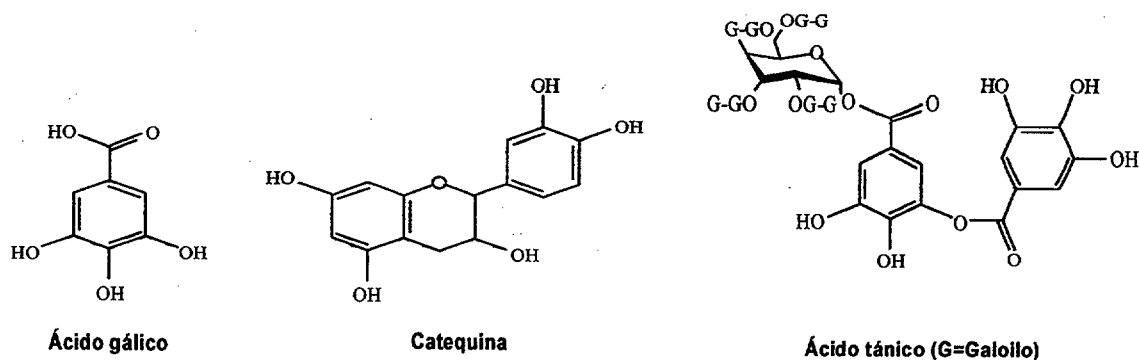


Figura 2: Ácido gálico y algunas estructuras de taninos.

Los taninos tienen una amplia gama de efectos sobre los animales y los microorganismos (Waterman y Mole, 1994). Son la segunda sustancia polifenólica más abundante en los vegetales, después de la lignina (Bhat y col., 1998), y presentan una gran semejanza estructural con ella (William y col., 1986). En animales, especialmente rumiantes, estos efectos incluyen disminuciones en la ingesta de alimento y en la utilización de nutrientes y toxicidad a altos niveles (van Soest, 1994; Chung y col., 1998). Los taninos han sido frecuentemente considerados como tóxicos para los microorganismos y esta actividad es debida principalmente a la inhibición de enzimas, privación de sustratos, acción sobre membranas y privación de iones metálicos (Reed, 1995; Chung y col., 1998). No obstante algunos hongos, bacterias y levaduras son bastantes resistentes a los taninos y pueden incluso degradarlos (Scalbert, 1991; Saxena y col., 1996; Bhat y col., 1997).

Aún no se conocen en su totalidad las funciones de los taninos, si bien queda claro que intervienen en el crecimiento de los vegetales y en su defensa frente a distintos agentes patógenos (Scalbert, 1991). Su capacidad para formar fuertes complejos con proteínas es el aspecto más importante de sus efectos nutritivos y tóxicos (Hagerman y Butler, 1981). La fortaleza de estos complejos depende de las características de ambos, taninos y proteínas (peso molecular, estructura terciaria, punto isoelectrico, y sitios de enlace). Los taninos tienen un número grande de grupos hidroxil fenólicos libres que forman enlaces de hidrógeno fuertes con proteínas y carbohidratos (Haslam, 1989). Pueden también formar complejos con proteínas mediante enlaces hidrofóbicos (Oh y col., 1980). Además, los taninos forman enlaces covalentes con proteínas mediante reacciones de polimerización oxidativa como resultado del calentamiento, exposición a radiación UV y la acción de una polifenoloxidasas (Reed, 1995).

1.2. Los hongos.

Los hongos pertenecen al Reino Mycota, el cual se caracteriza por ser organismos heterótrofos que obtienen su alimento de la materia orgánica, en descomposición (saprófitos) o viva (parásitos), a través de sus células, por medio de la absorción. Son unicelulares o pluricelulares con estructura de talo. Al igual que las plantas sus células poseen una pared celular pero se diferencia de ellas porque está compuesta de quitina.

Pasan la mayor parte de su vida en su etapa vegetativa alimentándose por medio de filamentos llamados hifas, que conforman los micelios, o en la forma unicelular. Cuando las condiciones ambientales son apropiadas desarrollan su fase reproductiva formando carpóforos o setas. Durante esta fase, producen esporas sexuales (producto de la meiosis) que son distribuidas mediante una gran diversidad de mecanismos ambientales y que les permite colonizar nuevos sustratos o aparearse con esporas de otras cepas de la misma especie, pero de distinto sexo, para dar continuidad a su ciclo de vida. En algunos casos, cuando producen estados asexuales, (como es el caso de *Sporotrichum pulverulentum* que es el anamorfo de *Phanerochaete chrysosporium*) los micelios desarrollan células especializadas que producen conidiosporas, por simple mitosis, que es un mecanismo de reproducción asexual muy eficaz para la supervivencia de los micelios. Finalmente, en algunas especies se desarrollan esporas de resistencia llamadas clamidosporas que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas.

Los hongos son importantes para la humanidad por muy diversas razones. Son, junto con las bacterias, los degradadores más eficaces de todos los ecosistemas. Algunos hongos sostienen estrechas relaciones mutualistas con plantas superiores, invaden las raíces de estas últimas y luego desarrollan hifas hacia el suelo, incrementando así la capacidad de las plantas para absorber agua, minerales y sustancias nutritivas del suelo al disponer de mayor superficie radicular. Estas

asociaciones se denominan micorrizas; su presencia generalizada aumenta considerablemente la densidad de las poblaciones vegetales de casi todos los ecosistemas terrestres.

Ciertos tipos de hongos producen antibióticos que pueden ser extraídos y utilizados para combatir infecciones bacterianas. Las enzimas hidrolíticas de los hongos se utilizan en diversos procesos industriales. Cuando crecen sobre salvado caliente de trigo o de arroz, algunas especies fúngicas producen una amilasa que se usa en la fermentación alcohólica. Las proteasas que se obtienen de otros hongos se emplean en la fabricación de pegamento líquido. La producción industrial de alcohol etílico (etanol) se realiza por fermentación de melaza de caña de azúcar o de almidón hidrolizado mediante enzimas formadas por otros hongos. En el proceso de elaboración del pan se añade levadura a la masa para producir dióxido de carbono. Los hongos se utilizan en la producción industrial de ácido cítrico, ácido glucónico y de ácido gálico, el cual todavía se emplea en la fabricación de tintas y colorantes. Las resinas se elaboran a partir de ácido fumárico formado por el moho negro del pan. El ácido giberélico, que provoca aumento del crecimiento de las células vegetales, lo produce un hongo que causa una enfermedad en las plantas de arroz.

El aspecto negativo de los hongos son las enfermedades que producen en el hombre como enfermedades cutáneas (tiña y pie de atleta), infecciones vaginales, infecciones pulmonares. Además los parásitos micóticos también producen enfermedades en plantas, causando daños a gran escala, en los cultivos. Las royas que atacan al trigo y los tizones que destruyen las partes florales de muchas plantas son basidiomicetos muy nocivos. Por otra parte, una variedad de mohos pudre frutas y verduras almacenadas después de la cosecha.

A lo largo de la historia, la clasificación de los hongos ha presentado innumerables dificultades. Entre los principales temas de discusión sobre la clasificación de los hongos, se encuentra el hecho de incluir o no los hongos dentro del reino vegetal. Por el momento, se acepta una división del reino de los hongos en dos grupos: Mixomicetos (hongos mucilaginosos) y Eumicetos (hongos verdaderos) (Talbot, 1971; Alexopoulos y Mims, 1985). Los Mixomicetos a su vez se subdividen en cuatro clases: Acrasiomicetos, Hidromixomicetos, Mixomicetos y Plasmidioforomicetos. Los Eumicetos se separan en hongos inferiores (comúnmente conocidos como Ficomicetos, que en la actualidad se agrupan en dos subdivisiones: Mastigomicetos y Zigomicetos) y hongos superiores. Los hongos superiores se clasifican en Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos u hongos imperfectos, en función de las características de las células en las que se produce la meiosis y la formación de esporas sexuales.

1.2.1. Los hongos de podredumbre blanca.

La lignina es un biopolímero aromático natural, de estructura tridimensional amorfa muy compleja y variable, que forma parte de la pared celular de las plantas superiores y que se acumula

preferentemente en la lámina media. En la naturaleza, la lignina se encuentra fuertemente asociada a la celulosa y hemicelulosa, y es el segundo compuesto orgánico más abundante en la superficie terrestre, después de la celulosa, representando el 25% de la biomasa de las plantas (Higuchi, 1990). Su compleja estructura y su naturaleza fenólica la hacen resistente al ataque de microorganismos, existiendo pocos grupos capaces de alterar o degradar significativamente este polímero.

En los últimos años se ha intensificado el estudio de microorganismos capaces de degradar la lignina. Los principales conocimientos acumulados hasta la fecha sobre esta degradación aparecen reflejados en las siguientes revisiones: Cheng y Chang (1985); Kirk y Shimada (1985); Buswell y Odier (1987); Kirk y Farrell (1987); Eriksson y col. (1990); Blanchette (1991); Boominathan y Reddy (1992); Gold y Alic (1993); Reddy y D'Souza (1994); Cullen (1997); Garg y Modi (1999); Leonowicz y col. (1999); Have y Teunissen (2001).

Entre los microorganismos que participan en la biodegradación de la lignina se encuentran diferentes grupos de bacterias y hongos que producen su modificación o parcial despolimerización (Berrocal y col., 1997; Hernández-Coronado y col., 1997; Garg y Modi, 1999; Claus, 2003). Sin embargo, hasta el momento, los más eficaces y quizás los más estudiados degradadores de lignina son los llamados hongos de podredumbre blanca, que incluyen varios cientos de especies de basidiomicetos y unos pocos ascomicetos (Buswell y Odier, 1987; Kirk, 1987; Hatakka, 1994; Cullen, 1997).

En la mayoría de los ambientes terrestres suele predominar la degradación fúngica de la madera, sin embargo, en ambientes acuáticos o en tierras saturadas de agua, la madera es atacada generalmente por bacterias (Blanchette, 1995; Bjordal y col., 1999). Las investigaciones sobre las características de la degradación, asociadas con el ataque bacteriano de la madera, son muy recientes. Aunque no existe una comprensión completa de cómo las bacterias degradan la madera, se ha mostrado que ocurren unas pautas claras en el ataque, y se han descrito tres principales formas morfológicas de la degradación de la pared celular del tejido vegetal por bacterias como son la erosión, la cavitación y la formación de túneles (Daniel y col., 1987; Singh y Butcher, 1991; Blanchette, 1995; Daniel y Nilsson, 1998; Blanchette, 2000).

Se han determinado un buen número de bacterias capaces de degradar la lignina, entre ellas se cabe destacar los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomas*, *Aeromonas*, *Nocardia*, y *Arthrobacterium* (Amer y Drew, 1980; Crawford y Crawford, 1980; Crawford, 1981), pero en la mayoría de los casos, las bacterias sólo transforman la lignina haciéndola menos tóxica para su desarrollo. Caso especial es el género *Streptomyces* que pertenece al grupo de los Actinomicetos. Esta bacteria filamentosa ha mostrado capacidad para llevar a cabo procesos completos de

degradación de la lignina durante el metabolismo primario (Crawford y Sutherland, 1979; Pasti y col., 1991).

Los hongos degradadores de los materiales lignocelulósicos, presentes en la madera se dividen en tres categorías, según la naturaleza de la degradación (Eaton y col., 1980). Los nombres de estas categorías se basan en las características visuales de la degradación, en estado avanzado (Blanchette, 2000). La mayoría de los hongos de los dos principales grupos que producen la degradación, se clasifican taxonómicamente en la subdivisión Basidiomycota, y son los hongos de podredumbre blanca y los hongos de la podredumbre parda. Un tercer grupo lo componen los hongos de podredumbre blanda que se clasifican taxonómicamente en las subdivisiones, Ascomycota y Deuteromycota.

Hongos de podredumbre blanca.

La denominación de estos hongos se debe a que, al degradar preferentemente la lignina de las plantas leñosas, provocan la formación de un residuo de color blanco debido a la acumulación de celulosa y hemicelulosas (González y col., 1986). La degradación de la lignina ocurre a través de oxidaciones que provocan la progresiva despolimerización y liberación de compuestos de bajo peso molecular que, en algunos casos, son metabolizados hasta CO_2 y agua (Reid y Seifer, 1982; Cheng y Chang, 1985; Kirk y Farrell, 1987). Esta característica, exclusiva de los hongos de podredumbre blanca, de ser capaces, en determinadas condiciones, de mineralizar la lignina, despertó el interés por conocer los mecanismos biológicos implicados en este proceso, con vistas a sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

Entre los hongos que producen la podredumbre blanca habría que distinguir a su vez dos grupos: los que degradan simultáneamente la lignina y la celulosa, y los que preferentemente degradan la lignina (Kirk, 1971; Blanchette, 1991). Entre los primeros se encuentra *Phanerochaete chrysosporium* y *Heterobasidion annosum*, entre los segundos, algunos hongos del género *Pleurotus* y *Ganoderma* (Zadrazil y col., 1982; González y col., 1986; Zadrazil, 1987; Ríos y Eyzaguirre, 1992). Este segundo grupo es el que presenta unas características más interesantes para sus posibles aplicaciones biotecnológicas, ya que éstas requieren una deslignificación que no afecte de modo significativo a la celulosa, como por ejemplo en la obtención de fibras en la fabricación de papel y tejidos, y en la mejora de la digestibilidad para su aplicación como forraje para animales.

Esta degradación se localiza, generalmente, en las células colonizadas por las hifas de los hongos, quedándose cantidades sustanciales de la madera sin degradar, produciéndose una erosión progresiva de la pared celular, cuando los componentes se degradan simultáneamente o una agresión difusa, cuando es atacada por hongos que degradan preferentemente la lignina (Blanchette, 1991). Las pérdidas de fuerza entre los monómeros de los diferentes polímeros de la

madera no son significativas hasta etapas avanzadas de la degradación (Cowling, 1961; Zabel y Morrell, 1992). Los hongos de la podredumbre blanca son parásitos comunes del duramen, en árboles vivos, y son degradadores agresivos de "escombros" leñosos en ecosistemas forestales (Rayner y Boddy, 1988; Blanchette, 1991).

Phanerochaete chrysosporium (= *Sporotrichum pulverulentum*) ha sido, y es en la actualidad, el hongo de podredumbre blanca más utilizado en los estudios de degradación de la lignina. Este hongo presenta ciertas ventajas para su uso como modelo: tiene un crecimiento rápido, hay algunas cepas que son termófilas y produce esporas asexuales. *Phanerochaete chrysosporium* produce una degradación simultánea de los materiales lignocelulósicos, hecho que ha limitado su aplicabilidad en ciertos procesos biotecnológicos, como el biopulpeo. Otros hongos de podredumbre blanca muy estudiados a nivel fisiológico, bioquímico y genético son *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* (Niku-Paavola y col., 1988) *Bjerkandera adusta* (Field y col., 1992) y *Ceriporiopsis subvermispora* (Lobos y col., 1998).

Hongos de podredumbre parda.

Los hongos de podredumbre parda o cúbica se caracterizan por alterar la relación entre la lignina y los polisacáridos, de forma que, sin degradar la lignina, producen la hidrólisis de los polisacáridos (Kirk y Farrell, 1987). Descomponen fundamentalmente la celulosa y hemicelulosa de las maderas, observándose solamente una limitada disminución en el contenido de la lignina o transformaciones a nivel de desmetoxilaciones e hidroxilaciones en la posición 2 del anillo aromático, lo que produce estructuras ortodifenólicas que se autooxidan, y forman cromóforos que dan el color pardo al que deben su nombre (Kirk y Alder, 1969; Kirk, 1975; Kirk y Farrell, 1987).

La despolimerización de la celulosa se produce en las etapas iniciales de la colonización de la madera, causando una sustancial pérdida de las propiedades físico-mecánicas de la madera (Eriksson y col., 1990), a menudo más evidentes, visualmente, que las características de la degradación (Wilcox, 1968). Los carbohidratos de la pared de la célula se degradan extensamente, durante la degradación, dejando un sustrato modificado rico en lignina. La madera residual es marrón y a menudo presenta grietas cuando se seca produciendo la típica forma cúbica que la caracteriza. Los hongos de la podredumbre parda causan, comúnmente, la degradación de la madera en edificios, teniendo un gran impacto en edificios antiguos e históricos (Jennings y Bravery, 1991).

Hongos de podredumbre blanda.

Algunos hongos imperfectos del tipo ascomiceto como *Aspergillus* (Drew y Kadam, 1979) y *Fusarium* (Carnicero y col., 1992; Rodríguez y col., 1994), producen un tipo de degradación conocida como podredumbre blanda. Esta podredumbre fue caracterizada, en un principio, como

una superficie suave y degradada de la madera, en condiciones de excesiva humedad (Savory, 1954). Sin embargo, la podredumbre blanda puede ocurrir también en ambientes secos y puede ser macroscópicamente semejante a la podredumbre parda (Blanchette y col., 1990; Blanchette y Simpson, 1992). Se reconocen dos tipos de podredumbre blanda. El tipo 1 consiste en la formación de cavidades longitudinales generadas en las paredes secundarias de las fibras por la acción del hongo, mientras que el tipo 2 se refiere a una forma de erosión debida a la degradación completa de la pared secundaria de las células vegetales (Corbett, 1965). En el caso de la alteración tipo 2, la lámina media no es atacada y persiste aún en etapas avanzadas del deterioro. Las grandes pérdidas en la dureza de la madera se pueden asociar con el ataque de la putrefacción blanda. Las cavidades formadas en la madera, así como degradación extensa de la celulosa pueden tener como resultado que la madera adquiera características muy pobres en sus propiedades físico-mecánicas, siendo visualmente evidentes (Hoffmeyer, 1976). Cuando el proceso de degradación progresa, ocurre una pérdida extensa de los carbohidratos y las concentraciones de lignina aumentan en la madera residual.

1.2.2. Principales enzimas que intervienen en la degradación de la lignina.

La identificación y caracterización de los principales componentes del sistema ligninolítico: lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) (Glenn y col., 1983; Tien y Kirk, 1983), manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13) (Glenn y Gold, 1985), enzimas generadoras de H_2O_2 (Kersten y Kirk, 1987) y lacasas (EC 1.10.3.2) ha conducido a un mejor conocimiento de los mecanismos básicos de la degradación de la lignina (Cullen, 1997).

De estas enzimas que intervienen en la degradación de la lignina, las más estudiadas han sido las que están relacionadas con el ataque inicial a este polímero. Pertenecen, en su mayoría, a alguno de estos grupos: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas, por lo que el término “enzimas ligninolíticas” generalmente se refiere a enzimas de estos grupos.

Los aspectos básicos relacionados con las enzimas ligninolíticas han sido publicados en dos revisiones recientes que enfatizan en el estudio de las lacasas (Leonowicz y col., 2001) y la MnP (Hofrichter, 2002).

1.2.2.1. Enzimas ligninolíticas.

La lignina peroxidasa (LiP) es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo (hierro-protoporfirina IX) como grupo prostético (Tien y Kirk, 1984). Esta enzima cataliza la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos y se ha demostrado su capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos modelo de lignina (Glen y col., 1983).

El papel de la LiP en la ligninólisis podría ser la transformación adicional de los fragmentos de lignina que son liberados inicialmente por la MnP. La LiP no parece ser esencial en el ataque de la lignina, varios hongos de podredumbre blanca sumamente activos como degradadores no excretan esta enzima (por ejemplo, *Ceriporia subvermispora*, *Dichotomitus squalens*, *Panus tigrinus*, *Rigidosporus lignosus*) (Galliano y col., 1991; Maltseva y col., 1991; Périé y Gold, 1991; Hatakka, 1994). Se describió por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Glen y col., 1983; Tien y Kirk, 1984) y hasta la fecha se ha detectado actividad LiP en numerosos hongos de podredumbre blanca, aislándose hasta 10 genes codificantes para esta enzima en *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (Tien y Tu, 1987; Naidu y col., 1990ab; Zhang y col., 1991; Gaskell y col., 1994; Cullen, 1997). Otras especies de hongos interesantes de citar en los que se ha clonado genes *lip* son: *Trametes versicolor* (Jönsson y col., 1994), *Phlebia radiata* (Saloheimo y col., 1989), *Bjerkandera adusta* (Asada y col., 1992) entre otros.

Las MnP constituyen el segundo grupo de hemoproteínas extracelulares que requieren de iones manganeso libres para su actividad. Son también glicoproteínas que contienen el grupo hemo como grupo prostético. Inicialmente se consideró que la MnP representaba un papel secundario en la degradación de la lignina, dada su incapacidad para degradar dímeros no fenólicos. Sin embargo, actualmente se acepta que desempeña un papel muy importante en dicha degradación, ya que cataliza la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , siendo el Mn^{3+} generado un agente capaz de oxidar modelos fenólicos (originando radicales fenoxilo) y no fenólicos de lignina (Hammel y col., 1989; Popp y Kirk, 1991). Además, dado su pequeño tamaño, este ion puede actuar en zonas internas de la lignina inaccesibles a un ataque enzimático directo.

Los genes que codifican para las MnP son menos conocidos que los de las LiP, en cuanto a su número y estructura. Al igual que la LiP, la manganeso peroxidasa fue también descrita por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara y col., 1984). Se han aislado y clonado genes de esta enzima en otros hongos de podredumbre blanca como *Trametes versicolor* (Johansson y Nyman, 1996), *Pleurotus ostreatus* (Asada y col., 1995), *Pleurotus eryngii* (Ruiz Dueñas y col., 1999) y *Ceriporiopsis subvermispora* (Lobos y col., 1998; Tello y col., 2000).

Recientemente se ha descrito otro grupo de peroxidadas, denominadas peroxidadas versátiles (VP), que se consideraran como un híbrido entre MnP y LiP, ya que pueden oxidar no solamente Mn^{2+} , sino también compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos (Conesa y col., 2002). Esta peroxidasa versátil ha sido descrita en especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Heinfling y col., 1998a y b; Mester y Field, 1998).

En cuanto al tercer grupo de enzimas ligninolíticas, las lacasas, son enzimas pertenecientes al grupo de las “oxidasas azules”, que contiene varios átomos de cobre en su estructura. Son enzimas que, a diferencia de las LiP y las MnP, no necesitan de H_2O_2 para su acción catalítica. Se descubrieron antes que la LiP y la MnP, pues probablemente, el primer estudio de la presencia de lacasas en hongos fue realizado en 1897 (Mayer y Harel, 1979). Rösch en 1965 ya les atribuía un papel en los procesos ligninolíticos, pues se vio que estaban presentes en la mayoría de los hongos de podredumbre blanca estudiados.

Si bien la descripción de las lacasas es muy anterior a la de las peroxidasas, su estudio en relación a la biodegradación de la lignina fue, durante décadas, relegado a un segundo plano. Esto se debe fundamentalmente a dos razones: por una parte, el organismo tomado como modelo de la degradación de la lignina, *Phanerochaete chrysosporium*, puede degradar eficientemente este polímero en condiciones en las que no se detectan lacasas. Por otro lado, se pensaba que los sustratos sobre los cuales actuaban las lacasas se restringían a compuestos de tipo fenólico, ya que su potencial de oxidación podía no ser lo suficientemente alto como para producir la oxidación de estructuras no fenólicas. Esta situación ha cambiado radicalmente. Recientemente se ha visto que las lacasas, en presencia de mediadores redox apropiados, pueden oxidar compuestos no fenólicos (Collins y col., 1996; Bourbonnais y Paice, 1996; Eggert y col., 1996a; Bourbonnais y col., 1998; Johannes y Majcherczyk, 2000a). Además, se han identificado varios hongos de podredumbre blanca, entre ellos *Trametes versicolor*, que pueden degradar la lignina sin la participación de LiP (Périé y Gold, 1991; Archibald, 1993; Rüttimann-Johnson y col., 1993; Srebotnik y col., 1994; Eggert y col., 1996b). También se han estudiado mutantes lacasa negativos de *Pycnoporus cinnabarinus*, en los que se ha verificado una notable disminución de la capacidad de degradación de la lignina (Eggert y col., 1997).

Existen lacasas intracelulares y extracelulares, formas constitutivas e inducibles (Leonowicz y Trojanowski, 1975; Bollag y Leonowicz, 1984). Han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato, que reducen el oxígeno molecular a agua y son capaces de oxidar monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles y diaminas (Reinhammar, 1984).

La Biología Molecular de las lacasas ha sido estudiada exhaustivamente (Collins y Dobson, 1997; Cullen, 1997; Mansur y col., 1997; Ong y col., 1997; Karahanian y col., 1998; Mansur y col., 1998; Hatamoto y col., 1999; Holland y Tolman, 2000; González y col., 2003a y b). Los aspectos básicos relacionados con este tipo de enzimas aparecen desarrollados en las siguientes revisiones (Thurston, 1994; Sanchez-Ferrer y col., 1995; Giardina y col., 1996; Xu, 1996; Gianfreda y col., 1999; Xu, 1999; Dec y Bollag, 2000; Durán y Esposito, 2000; Husain y Jan, 2000; Rodakiewicz-Nowak, 2000; Durán y col., 2002; Mayer y Staples, 2002).

1.2.2.2. Enzimas cooperantes.

Junto a las enzimas denominadas “ligninolíticas”, el hongo produce otras enzimas implicadas, de modo indirecto, en la degradación de la lignina (Leonowicz y col., 1999). Dentro de este grupo de enzimas, a las que en un principio se les atribuyó un papel secundario en la degradación, destacan las enzimas productoras de peróxido de hidrógeno (principalmente glucosas oxidasas, ácido graso-CoA oxidasa, glioxal oxidasa y aril alcohol oxidasa). Se ha demostrado que, entre estas oxidasas, la glioxal oxidasa es la única secretada bajo condiciones ligninolíticas standard en *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk y Farrell, 1987), por lo que sería la enzima fundamental dentro de este grupo. Una propiedad fisiológica importante de esta enzima es su inactivación reversible en ausencia del sistema de las peroxidasas, lo que sugiere que la producción de H_2O_2 está regulada como respuesta a la demanda de las peroxidasas (Kersten, 1990; Kurek y Kersten, 1995).

La tiroxinasas es otra de las enzimas que cooperan con las ligninolíticas en la degradación de la lignina, teniendo una importante función en la degradación, pues está implicada en las reacciones que producen la ruptura de las uniones de lignina con la matriz de polisacáridos.

Por otra parte, el que “*in vivo*” se observe la degradación de la lignina por las enzimas ligninolíticas, mientras que “*in vitro*” predomine una repolimerización de los radicales libres formados, hace que se consideren también importantes un grupo de reductasas encargadas de reducir los compuestos inestables formados en la degradación, impidiendo su repolimerización. En este grupo destacan las quinonas reductasas como la celobiosa quinona óxido reductasa y la NADH quinona reductasa (Kirk y Farrell, 1987; Ander y col., 1990).

Recientemente se ha desarrollado un enfoque diferente del complejo mecanismo enzimático que participa en la degradación de los sustratos lignocelulósicos, propuesto por Leonowicz y colaboradores (1999). Estos autores parten de la hipótesis de la existencia de una interdependencia por retroalimentación en los procesos de degradación de la lignina y la celulosa (Westermarck y Eriksson, 1974), de manera que ambos están relacionados en ciertos puntos, y pueden acelerarse mutuamente. Conciben una maquinaria mucho más versátil, constituida por múltiples enzimas capaces de actuar individualmente o de manera cooperativa. Así, y según su función, las enzimas producidas por los hongos ligninolíticos de podredumbre blanca, las clasifican en tres grupos:

El primer grupo lo forman las enzimas que actúan directamente sobre los constituyentes de la madera, tanto los carbohidratos, como la lignina. Dentro de las enzimas que actúan sobre la lignina se incluyen las ya mencionadas, LiP, MnP y lacasas, y además las dioxigenasas como la protocatecolato 3,4-dioxigenasa; 1,2,4-trihidroxibenceno 1,2-dioxigenasa; y la catecol 1,2-dioxigenasa. El segundo grupo incluye las enzimas que cooperan con las del primer grupo, pero que no pueden atacar la madera por si mismas, como la superóxido dismutasa y la glioxal oxidasa.

Por último, el tercer grupo está formado por las enzimas de retroalimentación, que enlazan diferentes vías metabólicas durante la descomposición de la madera. Entre estas se puede mencionar la glucosa 1-oxidasa; piranosa 2-oxidasa (glucosa 2-oxidasa); aril alcohol oxidasa; veratril alcohol oxidasa; celobiosa: quinona oxidoreductasa y celobiosa deshidrogenasa.

Un caso particular lo constituyen los llamados compuestos mediadores (Evans y col., 1994). Se ha discutido la posibilidad de que, debido a su tamaño, las enzimas del complejo ligninolítico tengan dificultades para acceder a las estructuras de la pared celular donde se encuentra la lignina. Esta dificultad se vería resuelta, al menos parcialmente, por la acción de compuestos mediadores de bajo peso molecular, los que actuarían como mensajeros precursores de la degradación, produciendo una primera desestabilización de las moléculas del complejo lignocelulósico. Su acción permitiría entonces la iniciación del ataque ligninolítico de las enzimas. Entre los mediadores de bajo peso molecular y radicales activos estarían el alcohol veratrílico, oxalato, malato y el ácido-3-hidroxiantranílico (Evans y col., 1994; Eggert y col., 1996a). En el caso de la actividad catalítica de las lacasas, la función mediadora sería desarrollada también por algunos compuestos sintéticos, como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), que actuarían como transportadores de electrones e inhibidores de la repolimerización de los radicales formados durante la degradación (Bourbonnais y Paice, 1990, 1992, 1996; Johannes y col., 1996).

El descubrimiento de la cooperación entre nuevas enzimas, y de la participación de radicales y pequeñas moléculas como mediadores en la degradación, explica cómo estos hongos son capaces de atacar un sustrato tan complejo como es la madera y que es normalmente resistente al ataque de microorganismos. Esto no descarta la existencia de otros mecanismos de ataque aún por descubrir, o de otras enzimas que puedan estar implicadas en la degradación, si bien esta hipótesis se basa en reacciones bioquímicas y es necesario corroborarla con el análisis de la expresión de los genes que codifican para las enzimas involucradas en todas las fases del proceso.

1.2.3. Estructura y función de las lacasas.

Las lacasas fueron descritas por primera vez por Yoshida (1893) en el látex del árbol japonés *Rhus vernicifera*, y fueron caracterizadas como oxidasas que contenían metal por Bertrand (1985). Pertenecen al grupo de las enzimas llamadas "proteínas de cobre azules" u "oxidasas azules", denominadas así por el color azul intenso que les confiere la presencia de cobre. Este grupo incluye, además, las enzimas ascorbato oxidasa (presente en plantas) y la ceruloplasmina (presente en mamíferos) (Messerschmidt y Huber, 1990).

Son consideradas proteínas monoméricas constituidas por una cadena polipeptídica de unos 500 aminoácidos (Reinhammar, 1984; Thurston, 1994). Recientemente se ha determinado la estructura terciaria de la lacasa del hongo *Coprinus cinereus*, comprobándose que se trata de una proteína monomérica de 504 aminoácidos (Ducros y col., 2001). La estructura es similar a la descrita para la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina, presentando tres dominios en los que la estructura secundaria predominante es el barril- β , con pequeños fragmentos de α -hélice.

Las lacasas son producidas por plantas superiores y por hongos (Mayer y Harel, 1979; Thurston, 1994; Solomon y col., 1996; Harvey y Walker, 1999). Aunque también se ha visto la presencia de estas enzimas en bacterias (Claus y Filip, 1997; Alexandre y Zhulin, 2000; Hullo y col., 2001; Martins y col., 2002; Mayer y Staples, 2002; Claus, 2003), así como en insectos (Hopkins y Kramer, 1992; Diamantidis y col., 2000; Kramer y col., 2001). Sin embargo, algunos de los estudios que evidencian la presencia de lacasas en insectos se deben tratar con cautela, por ejemplo la presencia de la actividad enzimática detectada en el mosquito *Anopheles* parece no ser debida probablemente a una lacasa (Sidjanski y col., 1997).

La presencia de lacasas en plantas superiores parece estar mucho más limitada que en hongos. La lacasa en *Rhus vernicifera* ha sido muy estudiada, y la enzima ha sido caracterizada minuciosamente (Hüttermann y col., 2001). Toda la familia Anacardiaceae, de la cual este árbol es un miembro, parece contener lacasa en los conductos de resina y en la resina secretada (Hüttermann y col., 2001). Existen pocos estudios, de la presencia de esta enzima, en otras especies de plantas. El árbol *Acer pseudoplatanus* ha mostrado producir y secretar lacasa (Bligny y Douce, 1983; Tezuka y col., 1993), al igual que *Pinus taeda* (Sato y col., 2001) y *Populus euramericana* (Ranocha y col., 1999) que contienen ocho y cinco lacasas, respectivamente, expresadas predominantemente en el tejido del xilema. Otros estudios de Wosilait y colaboradores (1954) muestran la presencia de una lacasa en hojas de *Aesculus parviflora*.

La función de la enzima en los árboles es principalmente la de protección. Cuando los árboles son dañados, segregan una sustancia, llamada látex, que contiene gran cantidad de compuestos fenólicos y lacasa. Al entrar en contacto la enzima con el aire, se induce una reacción catalítica de oxidación de los fenoles produciendo radicales libres, que polimerizan espontáneamente para formar un plástico que sirve de protección a la herida hecha al árbol.

En las plantas, las lacasas están implicadas en la síntesis de lignina en los tejidos leñosos (Bao y col., 1993), sin embargo, en los hongos estas enzimas están involucradas en la degradación de la lignina (Ander y Eriksson, 1976; Kersten y col., 1990). Así mismo, se cree que juegan un papel muy importante en la patogenicidad de algunos hongos para las plantas (Leonowicz y col., 2001).

En *Aspergillus nidulans* se han purificado dos lacasas y estudiado sus funciones, determinando que una de estas enzimas está involucrada en la formación del color verde del conidio (Clutterbuck, 1972) y la otra está localizada en las células de Hülle donde posiblemente participa en la síntesis de pigmentos (Hermann y col., 1983). En otros hongos, como *Daldinia concentrica* y *Lentinus edodes*, la actividad lacasa esta asociada con la formación de pigmentos y de estructuras responsables de la rigidez de los agregados de micelio. En *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* y *Schizophyllum commune*, las variaciones en la concentración de lacasas están fuertemente relacionadas con la formación de cuerpos fructíferos (Wood, 1980 a y b), teniendo un papel muy importante en la adhesión célula-célula (Leathman y Stahmann, 1981). Además, la lacasa en hongos parece estar también involucrada en los procesos de esporulación.

El estudio de estas enzimas se ha incrementado en los últimos años, lo que ha permitido su utilización en tecnologías descontaminantes y en una gran variedad de procesos industriales oxidativos que serán vistos más adelante.

1.2.4. Reacciones catalizadas por las lacasas.

La lacasa es un oxidoreductasa capaz de catalizar la oxidación de varios compuestos aromáticos (especialmente fenoles) con la reducción concomitante del oxígeno a agua (Thurston, 1994). Esta reacción de oxidación básicamente se inicia a partir de un sustrato fenólico que es oxidado por la acción de la enzima.

En general las lacasas contienen cuatro átomos de cobre, que juegan un papel importante en los mecanismos catalíticos de la enzima. Los átomos del cobre se distribuyen en diferentes sitios y se clasifican en tres tipos, según sus características específicas espectroscópicas y funcionales (Yaropolov y col., 1994; Xu, 1996; McMillin y Eggleston, 1997; McGuirl y Dooley, 1999; Minussi y col., 1999; Durán y col., 2002).

Además de las lacasas azules típicas, también se han identificado otros 2 tipos de lacasa, lacasas blancas y amarillas, con propiedades catalíticas similares pero con diferencias en el centro activo. Las lacasas blancas se han detectado en *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y col., 1997), encontrándose en su centro activo 2 átomos de hierro, 1 de zinc y 1 de cobre, en lugar de los 4 átomos de cobre típicos de las lacasas azules. Las lacasas amarillas se han identificado en *Panus triginus*, *Phlebia radiata* y *Phlebia tremellosa* (Leontievsky y col., 1999). Se diferencian de las lacasas azules en que no tienen sitios de unión a cobre tipo I que es el responsable de la coloración azul de la gran mayoría de las lacasas purificadas hasta el momento.

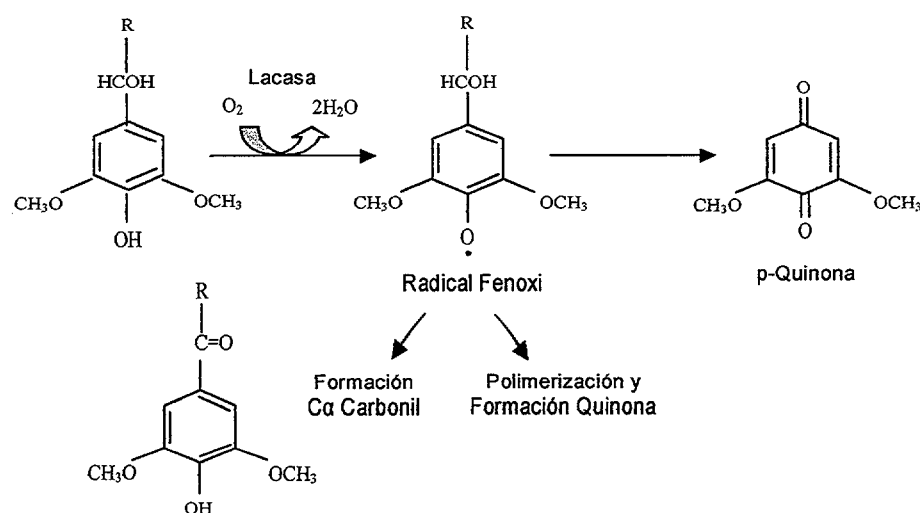


Figura 3: Reacción típica de lacasa: oxidación de fenol.

En una reacción típica de lacasa (Fig. 3), un sustrato fenólico es susceptible de oxidación con lo que se produce la sustracción de un electrón que genera un radical libre (Reinhammar y Malstrom, 1981). Esta especie activa puede ser convertida a una quinona, en una segunda etapa de oxidación, debido a que este producto inicial es muy inestable. La quinona, así como el producto radical libre, pueden experimentar reacciones no enzimáticas espontáneas que llevan a la polimerización (Higuchi, 1989). En términos generales, la lacasa puede operar como batería, almacenando electrones de reacciones de oxidación individuales para iniciar la reducción molecular del oxígeno, de hecho, se ha sugerido que otros compuestos intermedios del oxígeno (del tipo superóxido) también están involucrados en estas reacciones (Messerschmidt y col., 1992).

Se ha demostrado que la lacasa puede oxidar compuestos modelo de la lignina, produciendo reordenaciones en su estructura al provocar rupturas en los enlaces alquil-aril, oxidar alcoholes benéficos y romper anillos aromáticos generando una gran variedad de compuestos fenólicos oxidados (Bourbonnais y Paice, 1990, 1992). *In vitro* se ha llegado a determinar que estas enzimas son capaces de catalizar reacciones de polimerización, despolimerización, metilación y/o desmetilación (Leonowicz y col., 1979).

Las lacasas se caracterizan por una baja especificidad de sustrato ya que catalizan la oxidación de monofenoles, orto y para-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, algunos iones inorgánicos, arilaminas y varios compuestos fenólicos (Kawai y col., 1988; Eggert y col., 1996a). Todas estas características, además de ser fácilmente inducibles por diferentes compuestos (Fåharaeus y Reinhammar, 1967; Gigi y col., 1980; Ardon y col., 1996; Koroljova-Skorobogat'ko y col., 1998; Carbajo y col., 2002) hacen que estas enzimas tengan un gran potencial de aplicación en procesos biotecnológicos.

1.2.5. Genes que codifican para las lacasas y su regulación.

La mayoría de los hongos degradadores de lignina crecen en hábitat donde hay una gran variedad de sustratos de tipo aromático, existiendo una dependencia absoluta relacionada con la eficiencia de su maquinaria enzimática que les permite degradar este tipo de moléculas. Este hecho, pudo producir una presión evolutiva que originó el surgimiento de familias de genes que codifican para diferentes izoenzimas (Valderrama y col., 2003).

Los estudios bioquímicos de las enzimas ligninolíticas muestran que las enzimas LiP, MnP y lacasas son codificadas por familias de genes que se encuentran muy relacionados entre sí (Cullen, 1997). Probablemente la existencia de este complejo sistema enzimático, con una gran cantidad de isoformas, tenga que ver con la supervivencia del hongo.

El análisis de secuencias de estos genes, que codifican para las enzimas ligninolíticas, muestra que, en su multitud de variantes e isoformas, hay regiones que se encuentran muy conservadas. Las lacasas tienen una alta conservación en las regiones que codifican para las uniones a cobre de la enzima, que además muestran homología con las de genes que codifican para la enzima ascorbato oxidasa de plantas superiores y las ceruloplasminas de mamíferos, todas ellas agrupadas dentro de las oxidasas azules al que pertenecen las lacasas (Mansur, 1996). Las lacasas también muestran conservadas las posiciones que ocupan los diferentes intrones en distintos genes de lacasa (Wahleithner y col., 1996).

El primer gen de lacasa secuenciado fue el del hongo ascomiceto *Neurospora crassa* (Germann y Lerch, 1986). Más tarde se dieron a conocer las secuencias de otros genes de lacasa pertenecientes al ascomiceto *Aspergillus nidulans* (Aramayo y Timberlake, 1990) y al basidiomiceto *Coriolus hirsutus* (Kojima y col., 1990). Desde entonces, y hasta la fecha (enero 2004) han sido secuenciados genes de lacasa de 30 especies diferentes de hongos (tabla 2), aunque existen evidencias de muchos más genes de lacasa aún sin publicar. Esto demuestra, de manera clara, el gran interés que despiertan estas enzimas.

La primera familia de genes de lacasa se describió en 1993, cuando Perry y colaboradores demostraron la presencia de dos genes de lacasa en un mismo cromosoma de *Agaricus bisporus*. Más adelante se describió una familia de 5 genes situados en diferentes cromosomas en *Trametes villosa* (Yaver y col., 1996; Yaver y Golighytly, 1996); 4 genes en *Rhizoctonia solani*, de los cuales tres de ellos estaban situados en "tandem" (Wahleithner y col., 1996); familia de 3 genes en *Pleurotus ostreatus* (Giardina y col., 1995; 1996; 1999) y en el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62 (Mansur y col., 1997; González y col., 2003b); 2 genes en *Trametes versicolor* (Ong y col., 1997) y *Lentinula edodes* (Zhao y Kwan, 1999).

Tabla 2: Genes de lacasa de hongos cuyas secuencias han sido publicadas.

Especie	genes	Referencia
<i>Agaricus bisporus</i>	2	Perry y col., 1993
<i>Aspergillus nidulans</i>	2	Aramayo y Timberlake, 1990; Scherer y Fischer, 1998
<i>basidiomiceto PM1</i>	1	Coll y col., 1993
<i>Basidiomycete C30</i>	2	Klonowska y col., 2002
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	1	Karahanian y col., 1998
<i>Coprinus cinereus</i>	3	Yaver y col., 1999
<i>Coprinus congregatus</i>	1	Kim y col., 2001
<i>Coriolopsis gallica</i>	1	Calvo, 1995
<i>Coriolus hirsutus</i>	1	Kojima y col., 1990
<i>Coriolus versicolor</i>	2	Iimura y col., 1992; Mikuni y Morohoshi, 1997
<i>Cryphonectria parasitica</i>	1	Choi y col., 1992
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	Williamson, 1994
<i>Gaeumannomyces graminis var. graminis</i>	2	Litvinseva y Henson, 2002a
<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	3	Litvinseva y Henson, 2002b
<i>Lentinula edodes</i>	2	Zhao y Kwan, 1999
<i>Marasmius quercophilus</i>	1	Dedeyan y col., 2000
<i>Myceliophthora thermophila</i>	1	Berka y col., 1997
<i>Neurospora crassa</i>	1	Germann y Lerch, 1986; Germann y col., 1988
<i>Phlebia radiata</i>	1	Saloheimo y col., 1991
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4	Giardina y col., 1995; 1996; 1999; Okamoto y col., 2003
<i>Podospira anserina</i>	1	Fernández-Larrea y Stahl, 1996
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	2	Temp y col., 1999; Egger y col., 1998;
<i>Rhizoctonia solani</i>	4	Wahleithner y col., 1996
<i>Schizophillum commune</i>	1	Hatamoto y col., 1999
<i>Rigidoporus microporus</i>	1	Liu y col., 2003
<i>Trametes pubescens</i>	2	Galhaup y col., 2002
<i>Trametes sp. I-62</i>	3	Mansur y col., 1997; González y col., 2003a
<i>Trametes troglit</i>	1	Colao y col., 2003
<i>Trametes versicolor</i>	1	Jönsson y col., 1995
<i>Trametes versicolor</i>	2	Ong y col., 1997; O'Callaghan y col., 2002
<i>Trametes villosa</i>	5	Yaver y Golightly, 1996; Yaver y col., 1996

La regulación de la expresión génica varía entre los genes que codifican para los diferentes tipos de enzimas ligninolíticas, en las distintas especies de hongos de podredumbre blanca, incluso es diferente para las cepas de una misma especie. Genes de secuencia muy similar, que pertenecen a una misma familia, pueden presentar un patrón de expresión diferencial que los distinga (Pease y Tien, 1992; Wahleithner y col., 1996; Yaver y Golightly, 1996; Yaver y col., 1996; Collins y Dobson, 1997; Cullen, 1997; Gettemy y col., 1998; Mansur y col., 1998; Smith y col., 1998; Zhao y Kwan, 1999; Palmieri y col., 2000; González y col., 2003a y b). Con el desarrollo de las técnicas basadas en la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se ha visto facilitado el estudio de esta expresión diferencial.

Existen diversos parámetros de cultivo que pueden afectar los niveles de expresión de estas enzimas, como son las fuentes de carbono y nitrógeno (Pease y Tien, 1992; Gettemy y col., 1998;

Mansur y col., 1998; Zapico, 1999; Téllez, 2002), la adición de alcohol veratrílico u otros inductores (Leisola y col., 1987; Barbosa y col., 1996; Hofrichter y Fritsche, 1997; Mansur y col., 1998; Carbajo y col., 2002; González y col., 2003b; Arana-Cuenca y col., 2004), de ácidos grasos, manganeso, los cambios de temperatura (Ashter y col., 1988; Gold y col., 1991), la presión parcial de O₂ (Reid y Seifert, 1982), la presencia o ausencia de agitación (Ashter y col., 1988) y el pH (Reid, 1979).

La mayoría de los hongos ligninolíticos producen lacasa constitutivamente. Pero se ha visto que variando las condiciones de cultivo o adicionando inductores, como la 2,5-xilidina, el ácido ferúlico o el alcohol veratrílico entre otros, es posible inducir la producción de otras lacasas o potenciar a las presentes. Esto se hace evidente en el caso de *Pleurotus ostreatus* que constitutivamente produce una lacasa (Youn y col., 1995) pero al cambiar las condiciones del medio de crecimiento es posible inducir la producción de otras 6 enzimas con características catalíticas diferentes (Eichlerova y Homolka, 1999; Giardina y col., 1999; Tinoco y col., 2001). Algo similar sucede con las enzimas de *Rhizoctonia solani* (Wahleintner y col., 1996), *Trametes versicolor* (Bourbonnais y col., 1995; Hofer y Schlosser, 1999), *Trametes villosa* (Yaver y col., 1996), *Picnoporus cinnabarinus* (Eggert y col., 1996a; Otterbein y col., 2000), *Trametes* sp. I-62 (Mansur, 1997; González, 2001).

También es frecuente observar que la actividad de esta enzima se ve aumentada cuando los hongos de podredumbre blanca se cultivan en presencia de efluentes industriales. Así, se ha visto como el basidiomiceto *Coriolopsis gallica* produce un aumento en el nivel de la actividad lacasa cuando en el medio de cultivo existe la presencia de efluentes de la industria papelera (Calvo y col., 1998). Igual ocurre con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62, cuando es cultivado en presencia de efluentes de la industria de destilación de alcohol a partir de mieles de caña (Mansur y col., 1997; González y col., 2000; González, 2001). Hay indicios que parecen relacionar los niveles de actividad lacasa con sustancias naturales como el ácido ferúlico (Leonowicz y Trojanowski, 1975; González, 2001), flavonoides (Pickard y Westlake, 1970), ácido tánico (Carbajo y col., 2002) o derivados de la lignina (Arora y Sandhu 1984).

1.2.6. Las lacasas y su potencial en aplicaciones biotecnológicas.

La característica de las enzimas ligninolíticas de ser relativamente inespecíficas y su capacidad de catalizar la oxidación de una amplia variedad de compuestos, incluidos fenólicos y no fenólicos, ha impulsado el estudio de su potencial aplicación biotecnológica. El llevar a buen término estas investigaciones constituye un desafío y una oportunidad para desarrollar procesos técnicamente optimizados en condiciones medioambientales seguras.

1.2.6.1. Aplicación en procesos de biopulpeo y bioblanqueo de la industria papelera.

La capacidad de los hongos de podredumbre blanca de degradar la lignina, posibilita la aplicación de estos microorganismos, o de sus enzimas oxidativas, en procesos industriales como el biopulpeo y el bioblanqueo para la producción de pulpa y papel (Messner y Srebrotnik, 1994). Se han probado basidiomicetos como *Ceriporiopsis subvermispora* (Akin y col., 1995; Akhtar y col., 1996) y *Antrodiella* sp. (Patel y col., 1994) en el pretratamiento de la madera para facilitar el pulpeo y mejorar las propiedades finales del papel.

El empleo de las enzimas, en lugar de los hongos, en estos procesos, ha demostrado ser más ventajoso al permitir realizar los tratamientos con mayor rapidez (Eriksson, 1989; Trotter, 1990). Además se han utilizado sistemas lacasa-mediador en el blanqueo de las pastas, como el patentado por LIGNOZIM (Call y col., 1990), que persiguen reducir el uso de reactivos químicos en este proceso, y por tanto disminuir el impacto ambiental causado por la industria papelera. La actualidad de estas investigaciones se manifiesta en el desarrollo de proyectos como el Proyecto OXEPI, que integró industrias y laboratorios de la Unión Europea, y en el cual participó el laboratorio donde se llevó a cabo el presente trabajo (Messner, 2000).

Otra vía para proteger el medio ambiente de la contaminación asociada con la producción de pulpa y papel, es mediante el tratamiento de las aguas residuales de la industria papelera. El estudio de la decoloración de este tipo de efluentes mediante el uso de hongos de podredumbre blanca o de sus enzimas, ha sido extensamente revisado por Garg y Modi (1999). Existen varios procesos patentados, como MyCoR® y Mycopor®, que utilizan *P. chrysosporium* en el tratamiento de las aguas residuales. El aislamiento en los últimos años de nuevas cepas de hongos, y los avances en la identificación de nuevas enzimas y de los procesos que subyacen en su acción catalizadora, abren nuevas posibilidades para su utilización el tratamiento de efluentes industriales derivados del procesamiento de la madera.

1.2.6.2. Aplicaciones en la industria alimentaria.

La lacasa es una enzima muy conocida y estudiada en el biorremediación, debido a su habilidad para degradar compuestos fenólicos (Gianfreda y col., 1999; Durán y Esposito, 2000). Los compuestos aromáticos, incluidos fenoles y aminas aromáticas, constituyen una de las mayores clases de contaminantes y están fuertemente regulados en muchos países (Karam y Nicell, 1997). Debido a esto son múltiples las aplicaciones de las lacasas y hongos ligninolíticos en la industria alimentaria (Minussi y col., 2002).

Según Crecchio y colaboradores (1995), la presencia de estos compuestos fenólicos en el agua para consumo y de riego, o en la tierra cultivada representa un peligro significativo para la salud. Estos autores describieron que una lacasa era capaz de eliminar los compuestos aromáticos xenobióticos naturales de suspensiones acuosas.

Otra aplicación de las lacasas o de los hongos productores de las mismas, reside en el tratamiento de efluentes de destilería. Estos efluentes, llamados vinazas, proceden de la producción de etanol por medio de la fermentación de la melaza de caña de azúcar y producen un impacto ecológico importante, debido a su alto contenido de materia orgánica soluble y su color marrón oscuro. El hongo de podredumbre blanca *Trametes* sp. I-62, ha sido probado en la decoloración de estos efluentes con interesantes resultados (González y col., 2000; González, 2001).

Muchos son los estudios realizados sobre el biotratamiento de efluentes procedentes de la producción del aceite de oliva. Estos son un producto secundario típico de esta industria y representan un gran problema ambiental en el área Mediterránea. Greco y col. (1999), compararon la utilización de una polifenoloxidasa inmovilizada naturalmente en la cáscara de aceituna y una lacasa purificada de *Trametes versicolor*, en el biotratamiento de este tipo de efluentes. Ambos sistemas enzimáticos mostraron una buena actividad en la polimerización de fenoles. La lacasa inmovilizada de *Lentinus edodes* produjo una decoloración parcial del efluente y disminuciones significativas en el contenido de polifenoles y difenoles, produciendo una disminución de la toxicidad del mismo (D'Annibale y col., 1999; 2000). Martirani y colaboradores (1996), detectaron que en el tratamiento de estos efluentes con lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus* disminuyó apreciablemente el contenido fenólico (hasta 90%) pero no hubo ninguna reducción de su toxicidad. Otros estudios de biodegradación de efluentes de la industria del aceite han sido realizados tanto con lacasa (Capasso, 1997; D'Annibale y col., 2000; Ruiz y col., 2002; Dias y col., 2004), como con los hongos de podredumbre blanca (D'Annibale y col., 1998; Yesilada y col., 1998; Kahraman y Yesilada, 1999; 2001; Jaouani y col., 2003; Dias y col., 2004). El efluente producto de la industria de aceite de oliva puede ser utilizado también en la producción de lacasas por hongos (Sanjust y col., 1991; Tomati y col., 1991; Pérez y col., 1998; Kahraman y Yesilada, 2001).

Las aplicaciones de las lacasas, no sólo se limitan a su uso en el tratamiento de desechos industriales, también se ha visto que es posible aplicarlas a tratamientos alimenticios. Brenna y Bianchi (1994) diseñaron un proceso de disminución de compuestos fenólicos y catequinas causantes de olores y sabores no deseados en mostos y vinos mediante la aplicación de la lacasa de *Trametes versicolor* inmovilizada sobre derivados de sílice. Otros estudios con esta lacasa, demostraron la eliminación del 90% de ácido ferúlico de una solución modelo y un 34% de disminución de compuestos fenólicos en el vino (Minussi y col., 1998).

Las lacasas pueden ser también utilizadas en la estabilización de la cerveza (Minussi y col., 2002). Como se ha visto, los compuestos polifenólicos presentes en la cerveza causan importantes “velos” cuando la cerveza es almacenada durante largos periodos a bajas temperaturas, e incluso pueden aparecer en la cerveza embotellada, representando un gran problema para la industria (McMurrough y col., 1999). El exceso de polifenoles es eliminado, tradicionalmente mediante un tratamiento con PVPP insoluble, sin embargo es difícil de manejar, sin crear un ambiente poco sano para los trabajadores, y es también un problema en el efluente final debido a su baja biodegradabilidad. Según Mathiasen (1995) una alternativa al tratamiento tradicional sería el agregar una lacasa al final del proceso, ya que el oxígeno no es deseado en la cerveza terminada, con lo que la adición de lacasa podría quitar cualquier exceso de oxígeno, aumentando la vida de almacenamiento de la cerveza, y eliminar parte de los polifenoles que puedan permanecer en la misma. Rossi y colaboradores, en 1988, y Giovanelli, en 1989, plantearon este potencial de la utilización de lacasa en la estabilización de la cerveza.

La obtención de alimento animal a partir de residuos agrícolas es otra de las aplicaciones de las enzimas ligninolíticas. Se ha demostrado que el tratamiento con estas enzimas aumenta la digestibilidad de los piensos obtenidos a partir de residuos agrícolas (Hatakka y col., 1989; Akin y col., 1993), lo que permite la revalorización de los mismos.

1.2.6.3. Decoloración de efluentes industriales textiles.

La industria textil, por el gran uso que hace de tintes sintéticos, necesita de un sistema eficiente para el tratamiento de sus efluentes coloreados. Estos tintes o colorantes, aún en muy bajas concentraciones, son muy solubles en agua generando desechos de coloración muy intensa. Aparte de sus efectos antiestéticos, ciertos colorantes de tipo “azo”, durante su biotransformación, generan sustancias potencialmente más tóxicas y en algunos casos, estos compuestos pueden ser cancerígenos y mutagénicos (Chung y Cerniglia, 1992).

El potencial de decoloración y desintoxicación de los hongos de podredumbre blanca y/o sus enzimas oxidativas, puede emplearse en estos procesos, gracias al conocimiento existente de la fisiología de estos organismos, así como de las características de biocatálisis y estabilidad de sus enzimas (Wesenberg y col., 2003).

Muchas son las investigaciones desarrolladas en el estudio de la decoloración de este tipo de colorantes y de efluentes derivados de la industria textil (Swamy y Ramsay, 1999; Rodríguez y col., 1999; Abadulla y col., 2000; McMullan y col., 2001; Robinson y col., 2001; Jarosz-Wilkolazka y col., 2002; Wesenberg y col., 2003). En estos estudios se utilizan tanto el tratamiento

con hongos ligninolíticos, como con sus enzimas oxidativas. Sin embargo, existen varias de estas investigaciones en las que la lacasa es la principal enzima implicada en la decoloración (Kirby y col., 2000; Robinson y col., 2001). Un ejemplo de ello, son las lacasas de *Phlebia tremellosa* y de *Pleurotus sajor-caju* (Chagas y Durrant, 2001), que fueron capaces de producir la decoloración de tintes, en ausencia de actividades LiP y MnP (Kirby y col., 2000). *In vitro*, también ha sido examinada la decoloración producida por enzimas ligninolíticas utilizando la lacasa de *Pyricularia oryzae* (Chivukula y Renganathan, 1995) y *Trametes versicolor*, LiP de *Phanerochaete chrysosporium* (Chivukula y col., 1995) y MnP (o, más exactamente, la peroxidasa versátil (VP)) de *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus eryngii* (Heinfling y col., 1998a; 1998b).

1.2.6.4. Otras aplicaciones de las lacasas.

Diferentes basidiomicetos, y algunas de las enzimas purificadas a partir de estos hongos, han demostrado su capacidad para degradar/mineralizar un amplio espectro de xenobióticos estructuralmente diversos y contaminantes persistentes en el medio ambiente como compuestos tóxicos de naturaleza fenólica y de bajo peso molecular (Bollag y col., 1988); clorofenoles (Aust, 1990; Roy-Arcand y Archibald, 1991; Lamar y col., 1995; Ullah y col., 2000); bifenoles policlorados (PCBs) (Thomas y col., 1992); nitrotoluenos (Valli y col., 1992; Scheibner y col., 1997); antraceno, fenantreno y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos (Johannes y col., 1996; Pickard y col., 1999); pesticidas como DDT, lindano, clordano, y toxafeno (Bumpus y Aust, 1987); polímeros sintéticos como poliacrilatos, poliacrilamida y nylon (Sutherland y col., 1997; Cameron y col., 2000).

1.3. *Coriolopsis gallica* y su aplicación en la degradación de efluentes industriales.

El hongo basidiomiceto de podredumbre blanca *Coriolopsis gallica* fue seleccionado en nuestro laboratorio, entre diferentes especies de basidiomicetos, por su capacidad para decolorar efluentes procedentes de la industria papelera, siendo aplicado, con éxito, en el biotratamiento y la decoloración de estos efluentes (Calvo y col., 1998; Zapico, 1999). La enzima lacasa, como su principal enzima ligninolítica, parece ser la responsable de este proceso. Su gen (*cglcc1*) ha sido clonado y secuenciado (Calvo, 1995) y se encuentra publicado en el GenBank con el número de acceso AY017340. La secuencia del ADN complementario de este gen también se encuentra publicada en el GenBank (AF263467).

Han sido realizados diversos trabajos en nuestro laboratorio con el fin de estudiar los posibles mecanismos de degradación y aplicaciones de este hongo, en base al estudio del gen de lacasa *cglcc1* y su expresión y regulación. En este sentido, Calvo y colaboradores (1998) estudió la decoloración de efluentes de la industria papelera con *Coriolopsis gallica*, con buenos resultados a

nivel de laboratorio. Zapico (1999), también realizó estudios con efluentes de la industria papelera y de regulación del gen por distintas fuentes de carbono y nitrógeno, hallando una clara influencia del efluente y de la fuente de carbono sobre los niveles de actividad lacasa. Carbajo y colaboradores (2002), estudiaron el efecto del ácido tánico, como posible inductor de la producción de la actividad lacasa en *Coriopsis gallica*. Sus resultados mostraron un aumento evidente de los niveles de lacasa extracelular, corroborados con un aumento en los niveles de transcripción del gen *cglcc1*, cuando el hongo era crecido en medios de cultivo suplementados con ácido tánico.

Por otra parte, Pickard y colaboradores (1999) han estudiado el metabolismo de diversos hidrocarburos policíclicos aromáticos por la cepa de *Coriopsis gallica* UAMH 8260, con la lacasa purificada de este hongo. Reyes y colaboradores, en 1999, trabajaron con la misma cepa de *C. gallica* y aplicaron la lacasa inmovilizada en el tratamiento de diferentes tintes de la industria textil. Bressler y colaboradores (2000) utilizaron esta cepa de *C. gallica* para oxidar carbazol, N-etilcarbazol, fluoreno y dibenzotiofeno, en presencia de los mediadores 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).

1.4. Expresión heteróloga de genes.

La década de 1970 marca el comienzo de la unión entre las técnicas bioquímicas para manipular el ADN *in vitro*, con las técnicas genéticas para transferir el ADN de una célula a otra. La nueva metodología resultante conocida con el nombre de Ingeniería Genética ha revolucionado el campo específico de la Biotecnología. A través del procedimiento de clonado de ADN, genes de cualquier tipo pueden ser aislados de su ambiente natural, analizados, alterados y reinsertados en el mismo tipo de organismo o en otro diferente. Es así que la producción de solventes, productos químicos, hormonas, antígenos, enzimas y otras sustancias de interés farmacológico puede realizarse en grandes cantidades, a través del clonado de genes específicos en organismos que pueden ser desarrollados a escala industrial.

Esta metodología ha contribuido, además, al conocimiento de las funciones del ADN, a la organización de los genes, a la regulación de la expresión y a la estructura primaria de proteínas. El aspecto principal del clonado es la propagación de un fragmento determinado de ADN en una línea celular en crecimiento. Este fragmento, para poder propagarse debe ser unido a una molécula transportadora o vector el cual sí es capaz de multiplicarse en el organismo hospedador.

1.4.1. Aspectos generales de la expresión heteróloga.

El objetivo principal de la ingeniería genética con fines industriales es lograr la correcta expresión a altos niveles del gen clonado en el microorganismo hospedador elegido. Desde el punto de vista tecnológico se trata de favorecer la síntesis del producto del gen clonado, incrementando el

contenido de copias del gen en la célula. Existen diversos sistemas para la transferencia y expresión del gen, que queremos producir de manera heteróloga, algunos de ellos son:

- La clonación de genes en plásmidos. Estos son moléculas de ADN circular extracromosomal que se replican independientemente. Son vectores de expresión que deben de ser capaces de entrar y replicarse dentro de la célula hospedadora. Un vector ideal debería ser pequeño, de fácil preparación y replicación en la célula hospedadora, no generar productos tóxicos para la misma, poseer uno o más marcadores, para facilitar una rápida y positiva selección, y contener al menos un sitio donde se pueda integrar el ADN exógeno, sin destruir una función esencial (replicación).
- Sistemas de integración cromosómica, que consisten en la integración del gen, en el genoma de microorganismo hospedador, de manera que conseguimos una localización estable del gen, evitando que se replique por medio de plásmidos. Una vez insertado en el cromosoma, el gen puede quedar allí de forma estable durante muchísimas generaciones sin necesidad de recurrir a presión selectiva.

Entre los microorganismos hospedadores más usados se encuentra el colibacilo *Escherichia coli*, probablemente el ser vivo más estudiado a nivel molecular, y del que se dispone de una vasta batería de métodos de manipulación genética *in vitro*. Pero para muchos experimentos se debe recurrir a otros hospedadores procariotas, como el *Bacillus subtilis*, u organismos eucariotas como levaduras, hongos y células animales.

Las bacterias fueron los primeros microorganismos hospedadores utilizados para el clonaje de genes eucarióticos, y las primeras en las que estos genes recombinantes se expresaron. En la actualidad, aunque no son las únicas, siguen ocupando un papel importantísimo en el clonaje de genes procedentes de otros microorganismos. Su versatilidad, tiempo de generación y bajo coste, coloca a las bacterias en una posición difícil de superar en cuanto a ventajas de clonaje. La clonación en bacterias ha permitido obtener a escala industrial algunas proteínas recombinantes, especialmente de interés terapéutico. Sin embargo, no siempre las proteínas de origen eucariótico se producen adecuadamente en hospedadores procarióticos, ya que a menudo son inestables o carecen de actividad biológica y normalmente no son excretadas al medio de cultivo. Por estas razones, la Ingeniería Genética ha desarrollado otros sistemas, principalmente eucarióticos, que salven al menos algunos de estos obstáculos.

En este sentido, las levaduras presentan una serie de ventajas: son eucariotas, y por lo tanto más semejantes a las células de los organismos superiores que los procariotas (por ejemplo, sus mecanismos de secreción). A diferencia de las bacterias, producen cierto tipo de modificaciones

postraduccionales en las proteínas (glicosilaciones en ciertos aminoácidos, eliminación de la metionina inicial, rotura proteolítica de un precursor inactivo, etc.), lo que puede hacer que las proteínas heterólogas de organismos superiores puedan alcanzar su actividad biológica (aunque esto no siempre está garantizado). A semejanza de las bacterias, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es muy fácil de manejar con métodos microbiológicos. *S. cerevisiae* está muy bien estudiada al nivel genético y molecular. No sólo se puede realizar genética clásica (mutagénesis y recombinación meiótica, alternancia de ciclo haploide y diploide), sino que cuenta con herramientas avanzadas de Ingeniería Genética, y su genoma se secuenció totalmente en 1996. Además, desde hace decenios, las levaduras se cultivan a escala industrial, y participan en multitud de procesos biotecnológicos. Además, algunas de ellas cuentan con la calificación oficial de “organismo reconocido como seguro” (GRAS), indispensable para poder usarlas en la obtención de sustancias terapéuticas y de consumo humano.

Por todo ello, las levaduras son los hospedadores eucarióticos de clonación más fáciles de usar, y una buena alternativa para intentar la producción industrial de proteínas de interés.

Los hongos filamentosos, y en concreto los del género *Aspergillus*, han sido muy utilizados como sistemas de expresión (Devchand y Gwynne, 1991; Jeenes y col., 1991; Gouka y col., 1997; Kruszewska, 1999; Punt y col., 2002), por su habilidad de producir niveles altos de proteínas homólogas extracelulares de una manera económica. Tienen ciertas ventajas frente a bacterias y levaduras como sistemas de expresión, y es que, a veces, estas son incapaces de expresar ciertas proteínas que requieren modificaciones tales como glicosilación y formación de puentes disulfuro. Además los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* también presentan la aprobación GRAS. Otra ventaja es que se pueden aislar recombinantes estables con lo que se facilita el control de la producción. Sin embargo posee limitaciones a la hora de expresar proteínas heterólogas, ya que los rendimientos de estas proteínas suelen ser bajos.

Aunque las células bacterianas son enormemente útiles para clonar, propagar y expresar genes de organismos superiores, las células de mamíferos siguen siendo las más idóneas para la producción de proteínas, por ejemplo humanas, en forma biológicamente activa. Las células de mamíferos constituyen el medio natural para la producción de proteínas con aplicación terapéutica. Avances recientes en Ingeniería Genética están facilitando la producción masiva de proteínas con interés farmacológico y biomédico en sistemas de células de mamíferos. Quizás el mayor riesgo que conlleva este tipo de producción a gran escala es que los vectores o alguno de los componentes de los vectores usados en estos experimentos son oncogénicos o proceden de virus oncogénicos, con lo que, en teoría, podrían inducir transformaciones de tipo tumoral.

1.4.2. Las levaduras como huéspedes de clonaje: *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras.

Las levaduras, en su calidad de microorganismos eucarióticos, pero a la vez unicelulares, representan un “puente biológico” entre bacterias y organismos superiores. Son una alternativa natural en la producción a escala industrial de proteínas de interés biotecnológico (Fincham, 1989; Russell y col., 1991; Romanos y col., 1992; Trueman, 1995; Agnan y col., 1997; Cereghino y Cregg, 1999) puesto que son capaces de llevar a cabo procesos que no realizan las bacterias y que pueden ser importantes para la expresión de un gen eucariótico en un sistema de expresión heterólogo (Baldari y col., 1987). Realizan acetilaciones N-terminales, N-glicosilaciones, fosforilaciones, eliminación de metionina inicial en la proteína madura, secreción proteica, procesamiento proteolítico, y permiten la unión y ensamblaje de subunidades en macromoléculas (Fincham, 1989; Eckart y Bussineau, 1996; Cereghino y Cregg, 1999).

La expresión de una proteína foránea, en levaduras, consiste fundamentalmente en cuatro pasos: primeramente, el clonaje de la secuencia de ADN que codifica para la proteína dentro de un “casete” de expresión, que contiene un promotor de la levadura y secuencias de terminación de la transcripción; en segundo lugar, la transformación y la conservación de esta fusión del ADN en el hospedador; en tercer lugar, la síntesis de la proteína bajo condiciones específicas de cultivo; y finalmente, la purificación de la proteína heteróloga y la comparación con la proteína nativa. Generalmente, se suele utilizar un promotor que sea regulable para la expresión de la proteína, debido a que así se pueden mantener los cultivos en un modo de “expresión apagada”, disminuyendo la selección de células mutantes que no están expresando la proteína durante la fase de crecimiento celular. Tal selección puede ocurrir como resultado de la carga metabólica agregada en las células, que expresan los altos niveles de la proteína foránea o el efecto tóxico de esta proteína en las células.

Varias especies de levaduras han sido estudiadas como sistemas heterólogos de expresión de proteínas (Russell y col., 1991; Romanos y col., 1992; Trueman, 1995; Eckart y Bussineau, 1996; Gellissen y Hollenberg, 1997; Müller y col., 1998; Piontek y col., 1998; Gellissen, 2000; Cregg y col., 2000; Cereghino y Cregg, 2000).

Una de las más utilizada y estudiada, como sistema de expresión, es *Saccharomyces cerevisiae* (Hitzeman, y col., 1981; Lemontt y col., 1985; Smith y col., 1985; Moir y Dumanis, 1987; van Arsdell y col., 1987; Buckholz y Gleeson, 1991; De Nobel y Barnett, 1991; Mumberg y col., 1994; Gellissen y Hollenberg, 1997; Parekh y Wittrup, 1997; Müller y col., 1998). Su nombre se refiere a su papel en la fermentación de la cerveza, pero también interviene en otros procesos como en la fermentación de vinos y en la elaboración del pan. Hay, pues, una larga tradición en la explotación

e investigación de este organismo por industrias biotecnológicas (Da Silva y Bailey 1991; Mendoza-Vega y col., 1994; Hensing y col., 1995; Eckart y Bussineau, 1996). En realidad, uno de los primeros productos comerciales elaborado con técnicas de Ingeniería Genética fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B, que fue producida en *S. cerevisiae* (Valenzuela y col., 1982).

Presenta una serie de ventajas frente a otras levaduras como sistema de expresión de proteínas. A semejanza de ciertas bacterias, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es muy fácil de manejar con métodos microbiológicos. Desde hace decenios, las levaduras se cultivan a escala industrial, y participan en multitud de procesos biotecnológicos. Además, cuenta con la calificación oficial de “organismo reconocido como seguro” (GRAS) y es una especie muy estudiada a nivel genético y molecular (Broach y col., 1991). Es uno de los pocos microorganismos eucarióticos que posee un plásmido natural no vírico, el “circulo de 2µm”, que ha facilitado enormemente la construcción de vectores y sistemas de expresión. Es también uno de los pocos eucariotas donde la mayoría de los genes están mapeados en los cromosomas (Heinisch y Hollenberg, 1993), pueden ser directamente sustituidos y mutagenizados y, además, se pueden aislar componentes cromosomales como centrómeros o telómeros, para manipularlos y formar cromosomas artificiales de gran utilidad en el clonaje de grandes fragmentos de ADN. Su genoma se encuentra totalmente secuenciado (Goffeau y col., 1996).

Aunque, como hemos visto, *Saccharomyces* posee grandes ventajas frente a otras levaduras, y se han alcanzado grandes éxitos en la expresión de proteínas, existe una serie de problemas a la hora de lograrlo a escala industrial: en los grandes volúmenes del fermentador, existe una gran frecuencia de pérdida de los plásmidos, incluso cuando usamos promotores inducibles que solo se activan al final del proceso. La proteína heteróloga excretada suele tener un patrón de glicosilación diferente al de la original, concretamente, existen oligosacáridos de más de 100 manosas, mientras que las proteínas naturales no suelen pasar de las 10 manosas por cada aminoácido modificado. A veces, la proteína, en vez de secretarse, se queda en el espacio periplásmico (Parekh y col., 1995; Parekh y Wittrup, 1997; Müller y col., 1998).

Por todo ello, se han desarrollado sistemas de expresión en otras especies de levaduras, como *Kluyveromyces lactis* (Swinkels y col., 1993), *Schizosaccharomyces pombe* (Giga-Hama y Kumagai, 1999), *Yarrowia lipolytica* (Gaillardin y Heslot, 1988), y las levaduras metilotróficas (Wegner, 1990; Gellissen y Hollenberg, 1997; Hollenberg y Gellissen, 1997; Gellissen, 2000) *Hansenula polymorpha* (Gellissen y col., 1991; van Dijk y col., 2000), *Pichia pastoris* (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg y col., 2000) y *Candida boidinii* (Hollenberg y Gellissen, 1997; Gellissen, 2000).

1.4.3. Expresión heteróloga de genes de lacasa.

Hemos visto anteriormente como las lacasas pueden ser utilizadas en múltiples aplicaciones biotecnológicas, pero para que estos procesos sean rentables, se necesitan sistemas que proporcionen altas cantidades de proteína a bajo coste. El estudio de la producción de la lacasa, por las cepas silvestres de hongos de podredumbre blanca, muestra que estas cepas no alcanzan, hasta el momento, los niveles mínimos de enzima como para que estas sean rentables. Por lo que, se están llevando a cabo investigaciones en busca de diferentes alternativas capaces de solucionar esta limitación, de entre las cuales, la más factible puede ser la expresión heteróloga de la enzima.

Las lacasas, como las demás enzimas ligninolíticas, son difíciles de expresar en sistemas de expresión que no sean fúngicos. Existen varios trabajos publicados de lacasas de hongos ligninolíticos expresados en hongos filamentosos, como *Aspergillus niger* (Record y col., 2002; Larrondo y col., 2003), *Aspergillus oryzae* (Wahleithner y col., 1996; Yaver y col., 1996; Berka y col., 1997; Yaver y col., 1999; Gouka y col., 2001), *Aspergillus nidulans* (Larrondo y col., 2003) y *Trichoderma reesei* (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991) (Tabla 3). Sin embargo, las levaduras han sido más ampliamente utilizadas como vehículos de expresión para genes de lacasas (Tabla 3), en concreto *Saccharomyces cerevisiae* (Kojima y col., 1990; Cassland y Jönsson, 1999; Hoshida y col., 2001; Larsson y col., 2001; Bulter y col., 2003) y *Pichia pastoris* (Jönsson y col., 1997; Gelo-Pujic y col., 1999; Otterbein y col., 2000; Hoshida y col., 2001; Brown y col., 2002; O'Callaghan y col., 2002; Soden y col., 2002; Colao y col., 2003; Liu y col., 2003). Recientemente, el gen de lacasa *cotA* de la bacteria *Bacillus subtilis* ha sido expresado en *Escherichia coli* (Martins y col., 2002).

Kojima y colaboradores (1990), publicaron la primera lacasa, del hongo *Coriolus hirsutus*, expresada de forma heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y detectaron la actividad de la enzima utilizando placas de agar con medio de cultivo y guaiacol, sin embargo ni la enzima heteróloga, ni los factores que afectan los bajos niveles de producción fueron estudiados. Desde entonces, se ha recorrido un largo camino en los estudios de expresión del gen de lacasa, lográndose buenos niveles de producción.

Existen múltiples ventajas relacionadas con la aplicación de lacasas recombinantes. Una de ellas reside en el estudio del papel de las lacasas en la biodegradación de la lignina o en la degradación de otros compuestos contaminantes del medio ambiente. En este sentido, Saloheimo y Niku-Paavola, (1991) observaron una modificación en la fracción soluble de una pasta kraft con una cepa de *Trichoderma reesei* transformada con la lacasa de *Phlebia radiata*. Arana (2002), clonó el gen lacasa de *Coriolopsis gallica* en dos levaduras: *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia*

lipolytica y aunque los niveles de actividad detectados no fueron muy elevados, se han obtenido interesantes resultados en la utilización de las levaduras en la industria del papel.

Tabla 3: Genes de lacasa expresados de forma heteróloga y publicados hasta el momento (Enero, 2004).

Lacasa	Microorganismo hospedador	Referencia
<i>Acremonium murorum</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Gouka y col., 2001
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	<i>Aspergillus nidulans</i> y <i>A. niger</i>	Larrondo y col., 2003
<i>Coprinus cinereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Yaver y col., 1999
<i>Coriolus hirsutus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kojima y col., 1990
<i>Fome lignosus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Liu y col., 2003
<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kiiskinen y Saloheimo, 2004
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Berka y col., 1997
<i>Phlebia radiata</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Saloheimo y Niku-Paavola, 1991
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Soden y col., 2002
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Otterbein y col., 2000
	<i>Aspergillus niger</i>	Record y col., 2002
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bulter y col., 2003
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Wahleithner y col., 1996
<i>Trametes sanguinea</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Hoshida y col., 2001
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hoshida y col., 2001
<i>Trametes trogl</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Colao y col., 2003
<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia Pastoris</i>	Jönsson y col., 1997
		Gelo-Pujic y col., 1999
		Brown y col., 2002
		O'Callaghan y col., 2002
		Larsson y col., 2001
<i>Trametes versicolor</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cassland y Jönsson, 1999
<i>Trametes villosa</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Yaver y col., 1996

Por otra parte, Cassland y Jönsson (1999) clonaron el gen de la lacasa de *Trametes versicolor* en *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de mejorar la capacidad de la levadura para fermentar azúcares provenientes de la lignocelulosa para transformarla en etanol, ya que los compuestos fenólicos asociados a la fermentación pueden ser inhibidores del crecimiento. Dos años más tarde, Larsson y colaboradores (2001), desarrollaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con un aumento en la resistencia a inhibidores fenólicos de la fermentación, demostrando la ventaja que supone la expresión de la lacasa en este proceso.

Gouka y colaboradores (2001) clonaron el gen de la fenoloxidasa de *Acremonium murorum* en *Aspergillus awamori* para evaluar su capacidad de blanqueo en la industria de la lavandería.

Una lacasa de *Myceliophthora thermophila*, tres lacasas de *Rhizoctonia solani*, y una de *Trametes villosa* fueron expresadas en *Aspergillus oryzae* (Berka y col., 1997; Wahleithner y col., 1996; Yaver y col., 1996). El trabajo de la expresión en *Aspergillus oryzae* tuvo como resultado la

comercialización de lacasa (Denilite II S, de Novo Nordisk) para el uso por la industria textil (Kierulff, y Pedersen, 1996).

El hecho de que la expresión heteróloga de genes de lacasa en los últimos años vaya enfocada hacia una aplicación biotecnológica, junto con los alentadores resultados que se están consiguiendo en los niveles de producción de este tipo de enzima en diferentes sistemas, estimula la continuación de su estudio, considerándolos como una buena apuesta en el desarrollo de la biotecnología industrial.

1.5. Objetivos del trabajo

Aunque existen numerosos estudios sobre el biotratamiento de efluentes de diferentes industrias, como la de producción de aceite de oliva (ver apartado 1.2.6. de Introducción), que posee características similares a las de los de la industria cervecera, como es la gran cantidad de compuestos polifenólicos; hasta la fecha no existe ningún trabajo realizado sobre el tratamiento de este tipo de efluentes procedentes de la industria cervecera con hongos de podredumbre blanca, ni con sus enzimas oxidantes extracelulares.

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se han realizado diversos estudios relacionados con la capacidad de degradación del hongo *C. gallica*, con buenos resultados sobre diferentes efluentes industriales. Se ha demostrado que las lacasas juegan un papel fundamental en el proceso y se ha realizado la expresión heteróloga del gen *cglcc1* en las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. La enzima recombinante ofrece alentadores resultados en cuanto a una posible aplicación en la industria del papel. Estos antecedentes avalan el estudio de *C. gallica* en la decoloración de los efluentes de la industria cervecera, con el fin de desarrollar nuevas alternativas en los sistemas de biotratamiento, bien sea utilizando el microorganismo, o la lacasa recombinante producida en otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Todo ello permitirá a su vez profundizar en aspectos fisiológicos y moleculares de la degradación mediada por enzimas ligninolíticas, que a pesar de haber sido intensamente estudiada, dista mucho de ser plenamente comprendida.

Para realizar este estudio se propone desarrollar los objetivos específicos que a continuación se mencionan:

- 1.- Caracterización físico-química del efluente procedente de la industria cervecera.
- 2.- Estudiar la capacidad de crecimiento y decoloración de *Corioloopsis gallica* sobre el efluente.
- 3.- Optimización de las condiciones y medios de cultivo para favorecer la degradación del efluente y análisis de la relación entre los niveles de actividad lacasa y la decoloración.
- 4.- Estudio del nivel de expresión del gen de lacasa (*cglcc1*) de *Corioloopsis gallica* en las mejores condiciones de decoloración.
- 5.- Estudios de la capacidad de decoloración del efluente con caldos enzimáticos con alta actividad lacasa.
- 6.- Diseño de un sistema de expresión heteróloga del gen de lacasa de *Corioloopsis gallica* en *Saccharomyces cerevisiae* con vistas a futuras aplicaciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. EFLUENTE

2.1.1. Caracterización del efluente.

El efluente utilizado para este estudio fue proporcionado por la industria cervecera Mahou S.A. Para su conservación se prepararon alícuotas, que se almacenaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

2.1.1.1. Determinación del pH.

La medida de los valores de pH se realizó utilizando un aparato Metrohm modelo 704 con electrodo de vidrio, diseñado para la medida del pH en soluciones.

2.1.1.2. Sólidos en suspensión.

Para la determinación de los sólidos en suspensión presentes en el efluente se tomaron muestras de 20 ml, por triplicado, en tubos de centrífuga (SS34) previamente tarados para poder determinar el peso de estos sólidos, y se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 20 minutos.

2.1.1.3. Determinación espectrofotométrica del color (Unidades de color).

La valoración espectrofotométrica del color del efluente se llevó a cabo mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 465 nm, después de haber ajustado el pH de la muestra a $7,6 \pm 0,1$ (CPPA, 1974). Este ajuste del pH es importante porque la intensidad del color es altamente dependiente del pH de la muestra. Es necesario preparar diluciones de la muestra hasta obtener valores de absorbancia comprendidos entre 0,1 y 0,5 unidades, que es el intervalo de linealidad del método. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

En el ensayo se utiliza una solución de platino-cobalto como patrón compuesta por cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6 : 1,246 g/L), cloruro de cobalto (CoCl_2 : 1g/L) y ácido clorhídrico concentrado (HCl : 100ml/L). El color del efluente se expresa en unidades arbitrarias de color. Una unidad de color (UC) es equivalente a la absorción de la luz a una longitud de onda de 465 nm de 1mg/L de platino en la solución patrón de platino-cobalto (1 UC=1 ppm de platino). Las unidades de color de la muestra se calcularon según la siguiente fórmula:

$$\text{UC} = 500 \cdot A_2 \cdot D/A_1$$

Donde:

A_1 : absorbancia de la solución de platino-cobalto (equivalente a 500 UC)

A_2 : absorbancia de la solución problema

D: factor de dilución de la solución problema

2.1.1.4. Demanda Química de Oxígeno (DQO).

La DQO expresa el contenido de materia orgánica en una muestra, medido a través del consumo de oxígeno en la reacción con un oxidante fuerte. Su determinación se realizó según el procedimiento descrito en "Standard methods for the examination of water and wastewater" (1989).

En este método se lleva a cabo la oxidación química de la muestra en caliente, por la adición de un exceso del compuesto oxidante dicromato de potasio. La reacción se detecta a través del cambio de color que ocurre cuando se reduce el cromo ($\text{Cr}^{6+} \rightarrow \text{Cr}^{3+}$), al producirse la reacción de la muestra con la mezcla de dos soluciones: una de digestión, y otra de catálisis, a alta temperatura.

Solución de digestión:

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	10,216 g (desechado 12 h a 105°C)
HgSO_4	17 g
H_2SO_4	250 ml
H_2O	Hasta 1 L

Se disuelven el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el HgSO_4 en agua destilada y al final se añade el H_2SO_4 en un baño de hielo

Solución de catálisis:

Se disuelven 10,7 g de Ag_2SO_4 en un litro de H_2SO_4 concentrado.

Método:

Se mezclan en tubos, con tapón de baquelita 2,5 ml de muestra, 3,5 ml de solución de catálisis y 1,5 ml de solución de digestión. Se agitan bien las mezclas preparadas y se colocan, durante 2 horas, en una estufa previamente calentada a 105°C. Transcurrido ese tiempo, se dejan enfriar hasta temperatura ambiente, se mezclan nuevamente y se mide la absorbancia a 610 nm.

Se utiliza como patrón una solución de ftalato ácido de potasio (KH-ftalato) de concentración 8,5 g/L, que corresponde a 10 g/L de DQO. A partir de esta solución se preparan una serie de diluciones que cubren el intervalo de concentraciones desde 0 a 0,8 g/L, en el que es lineal la relación entre estos valores y la DQO de la solución patrón de KH-ftalato.

La serie de diluciones se preparó de la siguiente manera:

Solución patrón (ml) (completar hasta 100 ml con H_2O)	DQO (mg/L)
0,0	0
0,5	50
1,0	100
2,0	200
4,0	400
6,0	600
8,0	800

Estos patrones se utilizan para elaborar la curva de calibrado, que es la que se obtiene al representar gráficamente los valores de DQO (g/L) y las lecturas de absorbancia correspondientes. A continuación se realiza el análisis de regresión, y se calcula la ecuación de la recta. Los valores de DQO de las muestras problema, se determinan sustituyendo en esta ecuación los respectivos valores de absorbancia.

2.1.1.5. Cuantificación de Fenoles.

En el efluente se cuantificaron los fenoles totales, los fenoles de tipo tánico (taninos totales) y los taninos condensados (proantocianidinas). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las rectas de calibrado se obtuvieron a partir de seis o más puntos, realizando las determinaciones por triplicado, y se ajustaron por el método de mínimos cuadrados.

2.1.1.5.1. Fenoles totales.

Los taninos son compuestos ricos en grupos fenólicos, de tal forma que los métodos útiles para la determinación de fenoles pueden ser utilizados también satisfactoriamente en el análisis de taninos. Un método muy común utilizado en la determinación de fenoles totales es el método de Folin basado en las propiedades redox de los fenoles. Hay que tener en cuenta que este método no diferencia entre fenoles tánicos y no tánicos. Se basa en la oxidación de los fenoles, en medio básico, mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de complejos de los ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico), produciéndose, por una reducción del reactivo, una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presenta una coloración azul característica.

Para la cuantificación de los fenoles totales se utilizó este reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método de Singleton y Rossi (1965) con las modificaciones descritas por Cadahía y col. (1997).

2.1.1.5.2. Taninos totales.

Los taninos totales se calcularon indirectamente. Para ello se precipitaron los taninos usando la resina insoluble PVPP (polivinilpolipirrolidona) según describe Makkar y Goodchild (1996). A continuación se calcularon los fenoles totales (no tánicos) del sobrenadante utilizando la técnica anteriormente descrita. La resta de este valor del de los fenoles totales, calculado previamente, nos da como resultado los taninos totales.

2.1.1.5.3. Proantocianidinas.

Se empleó el método de la vainillina-ácido. Existen distintas variaciones del método que ha sido frecuentemente modificado con objeto de optimizarlo. Aquí se siguieron las bases del protocolo de Swain y Hillis (1959) con las modificaciones propuestas por Scalbert (1991).

Este método es un método selectivo, sensible y sencillo para la valoración de flavonoides y proantocianidinas. Así pues, es útil en la determinación de taninos condensados en presencia de

taninos hidrolizables u otros fenoles. Consiste en la valoración por espectrofotometría UV-VIS de los productos de adición, cromóforos, resultantes de la reacción de los aldehídos aromáticos, tales como la vainillina, con las proantocianidinas.

2.1.1.6. Condiciones óptimas de esterilización y pH.

Previo a la utilización del efluente en el biotratamiento con el hongo, se realizaron estudios para determinar las condiciones óptimas de esterilización del efluente, teniendo en cuenta que éste no debía precipitar o variar su color. Se tomaron muestras de 20 ml del efluente, por triplicado, y se esterilizaron a 110°C durante 30 min. sin que sufriera ninguna alteración. Así mismo, se tomaron distintas muestras de 20 ml de efluente alcalino (pH 13) y se ajustó el pH con ácido clorhídrico (33%), hasta un valor de pH entre 4,00 y 7,00, comprobando que, dentro de este rango de pH, el efluente no sufría ninguna alteración de precipitación ni cambio de color. Por debajo de pH 3 tiene lugar una precipitación de algunos componentes del efluente que modifican el color.

2.1.2. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR).

Se tomaron muestras de 20 ml de efluente, por triplicado, y se redujo su pH hasta 1 con HCl (33%). Tras 24 horas a 4°C, se recogió el precipitado mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Las dos fracciones resultantes, sobrenadante y precipitado, se congelaron a -70°C para ser posteriormente liofilizadas. De estas muestras liofilizadas, se elaboraron pastillas cristalinas mediante homogenización de 1mg de muestra y 300 mg de bromuro de potasio (KBr), en un mortero de ágata, en ausencia de humedad. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro de infrarrojos modelo Bruker IFS28, en un rango de longitudes de onda de 4000 a 600 nm.

2.1.3. Pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM).

La pirólisis analítica consiste en la degradación de compuestos generalmente de alto peso molecular, a una elevada temperatura (500-700°C) en una atmósfera de gas inerte, durante un corto período de tiempo (5-10 segundos). Los fragmentos resultantes de la pirólisis pueden ser analizados directamente por espectrometría de masas (Pi-EM) o bien separados previamente en un cromatógrafo de gases (Pi-CG-EM) como es este el caso.

Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de 20 ml de efluente que fueron acidificadas a pH 1 utilizando ácido clorhídrico (33%). Después de 24 h a 4°C, la fracción precipitada fue recuperada mediante centrifugación (11950 x g, 20 min) y tras dos lavados con agua destilada con el fin de retirar sales, se liofilizó. El peso seco de la fracción precipitada fue determinado gravimétricamente, por duplicado.

Condiciones del análisis de Pi-CG-EM

Para el análisis se utilizó aproximadamente un miligramo de muestra liofilizada que se colocó en un tubo cilíndrico de cuarzo y se pirolizó a 600°C durante 5 segundos, utilizando un pirolizador CDS Pyroprobe 100 equipado con filamento espiral de platino, y conectado a un sistema de cromatografía de gases y espectrometría de masas (temperatura de interfase de 150°C). El cromatógrafo de gases de columna capilar (Varian 3400) estaba acoplado mediante una línea de transferencia a un espectrómetro de masas (Finningan MAT 800). El cromatógrafo de gases (columna Supelco SPB-5: 30 mm x 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de grosor de película) fue programado desde 50 a 250°C a 5°C min^{-1} manteniendo la temperatura inicial durante 10 minutos. La temperatura del inyector y la de la línea de transferencia fueron 250 y 230°C, respectivamente. La fase móvil fue Helio (1 ml min^{-1}) y la razón de “split” fue fijada a 1/120. Los espectros de masas resultantes del impacto electrónico (1 scan s^{-1}) fueron adquiridos a 70 eV en un rango de 40 a 350 m/z.

La estimación del área de los picos de los diferentes productos de la pirólisis se hizo teniendo en cuenta que la suma de las áreas de todos ellos corresponde al 100% del ion total del cromatograma. La identificación de los productos de pirólisis se basó en la interpretación de sus espectros de masas y en la comparación con los registrados en la librería “National Bureau of Standard” (NBS) y con los datos de Pi-CG-EM publicados en la bibliografía (Pouwels y col., 1989; Ralph y Hatfield, 1991).

2. 2. MICROORGANISMOS Y SU MANTENIMIENTO

2.2.1. Hongos.

Corioloopsis gallica (IJFM A-241): Instituto Jaime Ferrán de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Trametes sp. I-62 (CECT 20197): Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales sobre Agricultura Tropical, La Habana, Cuba.

Phanerochaete chrysosporium (IJFM A-547): Instituto Jaime Ferrán de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

Mantenimiento. El mantenimiento de las distintas cepas de hongos se realizó mediante resiembras periódicas en tubos inclinados con medio 7 y/o en medio con agar-malta (extracto de malta 2%, agar bacteriológico 2%), y fueron incubados a 28°C durante el tiempo necesario para su desarrollo, aproximadamente 7 días, y posteriormente conservados a 4°C.

2.2.2. Levaduras.

Saccharomyces cerevisiae cepa W303-1b: leu⁻, trip⁻, his⁻, ade⁻, ura⁻. Departamento de Biología Molecular, CBM, UAM, Cantoblanco, Madrid, España.

Mantenimiento. La cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* fue conservada mediante resiembras periódicas en tubos inclinados con medio completo (YEP), descrito en el apartado 2.3.2.1., que fueron incubados a 30°C durante el tiempo necesario para su desarrollo, aproximadamente 4 días, y posteriormente se conservaron a 4°C. Las cepas transformadas fueron igualmente mantenidas en tubos inclinados pero conteniendo medio mínimo (MML) (apartado 2.3.2.2.) y conservadas a 4°C. Para su almacenamiento por un período largo de tiempo se tomaron alícuotas de un cultivo líquido de medio mínimo (MML) en fase de crecimiento exponencial a las que se les añadió glicerol, en condiciones estériles, a una concentración final de 20% (v/v) y posteriormente fueron conservadas a -70°C.

2.2.3. Bacterias.

Escherichia coli DH5 α : Cepa utilizada para la transformación con plásmidos. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (1×10^8 transformantes/ μ g de ADN). Además, posee una delección en el gen Z del operón *lac*, lo que hace posible la selección de plásmidos recombinantes por disrupción de la porción del gen de la β -galactosidasa en medio con IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido).

Mantenimiento. Para el mantenimiento a corto plazo, las cepas bacterianas se conservaron a una temperatura de 4°C en placas con medio LB-Agar (apartado 2.3.3.1.). Para el mantenimiento a largo plazo se tomaron alícuotas de un cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento, a las cuales se les añadió glicerol, en condiciones estériles, hasta una concentración final del 20% (v/v), para su posterior almacenamiento a -70°C.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 30 minutos, salvo los medios ricos en azúcares que se esterilizaron a 110°C durante 30 minutos. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar bacteriológico al 2% (p/v).

2.3.1. Medios de Cultivo para Hongos.

2.3.1.1. Medio 7 o Czapek-Dox modificado.

El medio 7 (Guillén y col., 1990) es un medio completo compuesto por:

Glucosa	10,0 g.	*Solución de elementos traza	
Tartrato de Amonio	2,0 g.	Na ₂ B ₄ O ₇ · H ₂ O	0,10 g.
Mg ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,07 g.
KH ₂ PO ₄	1,0 g.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g.
KCl	0,5 g.	MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,01 g.
Extracto de levadura	1,0 g.	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g.
Solución de elementos traza*	1,0 ml.	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ · 4 H ₂ O	0,01 g.
Agua destilada	hasta 1L.	Agua destilada	hasta 1L.

2.3.1.2. Medio Kirk.

El medio Kirk (Kirk y col., 1986) es un medio definido, limitante en nitrógeno y contiene:

Glucosa	10,0 g.	*Solución de elementos traza	
Tartrato de Amonio	0,2 g.	Acido nitriloacético	1,50 g.
Mg ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g.	MnSO ₄ · H ₂ O	0,50 g.
KH ₂ PO ₄	2,0 g.	NaCl	1,00 g.
CaCl ₂	0,1 g.	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 g.
Tiamina · HCl	1,0 mg.	CoCl ₂	0,10 g.
Alcohol veratrílico	57,0 µl.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 g.
Solución de elementos traza*	10,0 ml.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g.
Agua destilada	hasta 1L.	AlKSO ₄ · 12H ₂ O	0,01 g.
		H ₃ BO ₃	0,01 g.
		NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,01 g.
		Agua destilada	hasta 1L.

Nota: Es necesario señalar que el medio Kirk original (Kirk y col., 1986) no contempla la adición del alcohol veratrílico en su formulación.

2.3.2. Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.2.1. Medio completo (YEP).

Es un medio rico utilizado para el mantenimiento de la cepa silvestre. Está compuesto de:

Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	hasta 1L.

2.3.2.2. Medio mínimo de levaduras (MML).

Este medio se utilizó para la selección y el mantenimiento de las levaduras transformadas con el gen.

* Glucosa o Galactosa	20 g
Base de nitrógeno de levaduras sin aminoácidos	7 g
** Solución de Aminoácidos	24 ml
Agua destilada	hasta 1L.

* En aquellos cultivos de levaduras transformadas con el gen *cglccl* donde se quería producir la expresión de la proteína recombinante, se utilizó galactosa en lugar de glucosa, a la misma concentración, para inducir el promotor pGAL presente en el vector de expresión pYES2 utilizado para la transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

** Solución de Aminoácidos:

	Solución stock	Mezcla para 1 L de medio
Histidina	10 mg/ml	3 ml
Leucina	10 mg/ml	3 ml
Triptófano	10 mg/ml	3 ml
Adenina	2 mg/ml	15 ml
Uracilo	2 mg/ml	15 ml

Se esterilizó por filtración a través de filtro de 0,22 µm (Millipore)

2.3.3. Medios de cultivo para bacterias.

2.3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y col., 1989).

Se utiliza como medio general para el crecimiento de cepas de bacterias transformadas y el mantenimiento de las mismas.

Bacto-triptona	10,0 g.
Extracto de levadura	5,0 g.
NaCl	5,0 g.
Agua destilada	hasta 1L.

El pH se ajusta a 7,5 con NaOH 10 N

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, se añade ésta a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en condiciones estériles, tanto en medio sólido como líquido. Además, cuando se realiza la selección de transformantes por producción de actividad β -galactosidasa, se agrega al medio X-gal (sustrato de la β -galactosidasa) y el inductor IPTG, a concentraciones finales de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.3.3.2. Medio SOB (Hanahan, 1983).

Se utiliza para recuperar cepas recién transformadas y en la obtención de células competentes.

Bacto-triptona	20,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
NaCl	0,5 g
Agua destilada	hasta 1L

El pH se ajusta a 7,5. Antes de usar se añaden 20 ml/l de MgSO_4 1 M de una solución estéril.

2.4. CULTIVOS DE MICROORGANISMOS

2.4.1. Cultivos de Hongos.

2.4.1.1. Ensayos cualitativos en placa.

Los estudios en placa se realizaron utilizando medio 7 y medio Kirk preparados con agar 2% (p/v). Se realizaron modificaciones del medio Kirk que fueron las siguientes: se sustituyó la fuente de carbono del medio, la glucosa, por otras fuentes como fructosa, manosa y sorbosa a la misma concentración que el medio original, y se realizaron estudios en este medio con la adicción o no de alcohol veratrílico. Las placas fueron inoculadas en la zona central con un fragmento de agar de aproximadamente $5 \times 5 \text{ mm}^2$, procedente de un cultivo del hongo crecido durante 6-7 días en medio 7 sólido. La temperatura de incubación fue de 28°C en todos los casos, a menos que se especifique lo contrario. En todos los ensayos las placas fueron preparadas por triplicado y se prepararon controles abióticos, para confirmar que los cambios ocurridos eran debidos al crecimiento del

hongo. El crecimiento del hongo se controló midiendo diariamente el diámetro de la colonia y en los casos de decoloración, se registró el día de comienzo de ésta.

2.4.1.1.1. Degradación de colorantes poliméricos.

En los estudios de degradación de colorantes poliméricos de tipo antrona Azul de Ramazol y Poly R-478, estos se prepararon en soluciones stock al 5% (p/v) y fueron esterilizados por filtración mediante filtro Millipore de 0,22 μm . El Azul de Ramazol se disolvió en agua y el Poly R-478 en etanol al 60% y se adicionaron en condiciones estériles al medio de cultivo hasta una concentración final de 0,05% y 0,02% (p/v), respectivamente. El medio de cultivo utilizado para este ensayo fue el medio Kirk y variantes del mismo en las que se utilizaron otras fuentes de carbono: fructosa, manosa y sorbosa en la misma cantidad que la glucosa en el medio Kirk original.

2.4.1.1.2. Capacidad de oxidación del ácido tánico.

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Braddo y colaboradores (1996). Se prepararon placas conteniendo ácido tánico al 1% (en buffer fosfato 0,01 M, pH 6,0), y 3% de agar.

El estudio se realizó con *Corioloropsis gallica* y con *Asperguillus niger*, como control positivo del experimento, pues contiene tanasa. Tras 7 días de incubación se vio que, mientras *A. niger* había crecido y presentaba un halo de degradación del tánico, *C. gallica* no era capaz de crecer. Por lo que se modificó el medio, utilizando medio 7, sin fuente de carbono, y se le adicionó el ácido tánico al 1%.

2.4.1.1.3. Decoloración del efluente industrial.

En los cultivos donde se agregó efluente, éste fue previamente tratado reduciendo su pH inicial hasta $6,0 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (33%). El efluente se añadió hasta una concentración de 20%, 40%, 60% y 80% (v/v) según cada caso. Este ensayo se realizó en medio 7, medio Kirk sin alcohol veratrílico y medio Kirk con alcohol veratrílico. Los medios fueron preparados a una concentración 10X y se diluyeron a su concentración normal mediante la adición del efluente y agua.

2.4.1.2. Cultivos líquidos.

2.4.1.2.1. Preparación del inóculo.

Los preinóculos de *Corioloropsis gallica* se prepararon a partir de cultivos en placas Petri, con medio 7, en los cuales el micelio del hongo había cubierto totalmente la placa, aproximadamente 7 días. Se cortaron fragmentos de agar de aproximadamente 1 cm^2 , que se introdujeron en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml de medio 7 y 4 esferas de vidrio, las cuales permitieron una mejor dispersión de los propágulos de micelio. Este cultivo se incubó durante 24-48 h en agitación (120 r.p.m.) a una temperatura de 28°C. Transcurrido este tiempo se procedió a inocular los diferentes medios de cultivo ensayados. El preinóculo se obtuvo a partir de la fase líquida,

previamente filtrada a través de un colador estéril. El volumen del preinóculo en todos los casos fue de 1/10 (v/v) del volumen del cultivo.

2.4.1.2.2. Condiciones generales de los cultivos.

Todos los cultivos en medios líquidos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 500 ml, con 200 ml del medio de cultivo, que se especifica en cada caso. La temperatura de incubación en estos ensayos fue siempre de 28°C y la agitación de 110 r.p.m. Los matraces de cada ensayo fueron preparados por triplicado y siempre se cultivaron en paralelo controles abióticos de cada ensayo.

2.4.1.2.3. Cultivos suplementados con efluente.

El efluente utilizado en estas experiencias fue previamente tratado de forma que se reduce su pH inicial hasta $6.0 \pm 0,2$ mediante la adición de ácido clorhídrico (33%). El efluente fue esterilizado conjuntamente con medio de cultivo, sin que sufriera ninguna alteración de color ni precipitación.

En estas cinéticas suplementadas con efluente, los medios de cultivo (medio 7 y medio Kirk) fueron preparados en una concentración 10X y diluidos a 1X mediante la adición de efluente y agua. Las concentraciones de efluente ensayadas fueron de 20, 40 y 60% para el caso del medio 7 y 40% en todos los casos en que se realizó con medio Kirk.

El medio Kirk se preparó modificando su composición en relación a la fuente de carbono utilizada. Los ensayos se realizaron variando la cantidad de glucosa, aumentándola hasta 5 veces su concentración normal (10 g/l), por otro lado se preparó un medio Kirk sin fuente de carbono y por último se sustituyó la glucosa por sorbosa, a la misma concentración. En todos los casos se prepararon junto con los medios Kirk modificados, medios Kirk normales que se utilizaron como controles del ensayo.

2.4.1.2.4. Preparación de cultivos con alta actividad lacasa.

Para la obtención de un caldo de cultivo con una alta actividad lacasa, necesario para su posterior aplicación en la decoloración del efluente, se siguió el procedimiento desarrollado por Carbajo (2001). Se inocularon matraces con medio Kirk con el hongo y se dejaron crecer durante 5 días, transcurridos los cuales, se añadió al medio de cultivo una solución de ácido tánico a una concentración final de 100 μ M, como inductor de la actividad lacasa (Carbajo, 2001). A partir de aquí se fue siguiendo espectrofotométricamente, a diario, la actividad lacasa del caldo del cultivo hasta obtener su pico de máxima actividad.

2.4.1.2.5. Análisis gravimétrico de polifenoles en los cultivos.

Se tomaron muestras de diferentes días de los cultivos en medio 7 suplementados con efluente. La biomasa del hongo fue inicialmente retirada del caldo de cultivo mediante su filtración con

papel Miracloth. Posteriormente el filtrado se acidificó hasta pH 1 usando HCl (33%). Después de 24 horas a 4°C, la fracción polifenólica precipitada fue recogida mediante centrifugación (10000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C). Esta fracción fue congelada a -70°C, para ser posteriormente liofilizada. El peso seco de este precipitado fue determinado gravimétricamente y por duplicado.

2.4.1.2.6. Determinación del peso seco del micelio.

Con el fin de analizar el efecto del efluente sobre el crecimiento de *Coriopsis gallica*, el micelio de distintos días de cultivo, en la cinética en medio 7 suplementado con distintas concentraciones de efluente, se recogió mediante su filtración a través de filtros de papel Miracloth y se lavó varias veces con agua destilada, congelándose a -70°C para su posterior liofilización y determinación del peso seco.

2.4.2. Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para el cultivo de las levaduras transformadas de la cepa W-3031b de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el medio mínimo de levaduras (MML), al cual se le adicionaron los aminoácidos correspondientes a la auxotrofia de la levadura, salvo el uracilo, pues es el marcador que posee el vector utilizado para la selección de los transformantes.

Las levaduras, en todos los casos se incubaron a 30°C en agitación, salvo que el experimento requiera alguna condición diferente.

2.4.2.1. Medios sólidos para la detección de la actividad lacasa.

Para el estudio de la actividad enzimática lacasa, producida por las levaduras transformadas, se añadió al medio mínimo de levaduras (MML) los sustratos 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) y el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)) a concentraciones finales de 0,2 mM y 10 mM. A su vez, se realizó un estudio sobre la influencia de la concentración de cobre en la actividad lacasa producida por las levaduras transformadas. Para ello se utilizó medio mínimo de levaduras (MML) al que se añadió, además del sustrato ABTS, sulfato de cobre a concentraciones finales de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mM. Se hicieron modificaciones de la fuente de carbono utilizada en el medio mínimo de levaduras (MML), que es galactosa, añadiéndole, simultáneamente manosa y galactosa a distintas concentraciones finales con el fin de comprobar su influencia sobre el crecimiento y la actividad de la lacasa recombinante.

2.4.2.2. Medios líquidos para levaduras transformadas con el gen *cglc1A*.

Para el estudio de la actividad lacasa, en medios líquidos, del gen *cglc1A* de *Coriopsis gallica* expresado en forma heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, se inocularon matraces de 250 ml con 100ml de medio mínimo URA⁻ y con una concentración final de 0,4 mM de CuSO₄. Estos matraces fueron inoculados con una solución, obtenida a partir de la disolución de una colonia de

las levaduras transformadas, en agua estéril. Su incubación se realizó a 30 °C, salvo que se indique lo contrario.

La actividad lacasa fue monitoreada mediante la medición espectrofotométrica de la muestra con los sustratos ABTS y 2,6-dimetoxifenol a una longitud de onda de 436 y 468 nm, respectivamente. La mezcla de reacción se preparó mezclando partes iguales de la muestra y de una solución de ABTS 0,1 M en tampón acetato 0,1 M pH 5,2, o en el caso del 2,6-dimetoxifenol se realizó preparando una mezcla 1:1 (vol/vol) con la muestra y el 2,6-dimetoxifenol que se diluyó en tampón acetato 0,1M pH 5 hasta una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción.

Las distintas variaciones realizadas tanto en los medios de cultivo como en las mediciones espectrofotométricas de la actividad lacasa son indicadas en el apartado correspondiente de Resultados.

2.4.3. Cultivos de bacterias.

Para su crecimiento, las bacterias se incubaron a 37°C empleando como medio sólido LB con agar (2% p/v) y como medio líquido LB, salvo que el microorganismo o el experimento requieran otras condiciones, en cuyo caso se indicará en el protocolo correspondiente.

2.5. Determinaciones de actividades enzimáticas.

2.5.1. Actividad lacasa.

Estos ensayos de actividad lacasa se realizaron en todos los cultivos sumergidos, tanto los realizados con *Coriopsis gallica*, como los realizados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* transformada.

La unidad de actividad lacasa se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto. Se utilizaron como sustratos el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)) ó el 2,6-dimetoxifenol, cuando se detectaron interferencias en la medición con ABTS debidas a la capacidad de algunos compuestos aromáticos de reducir este compuesto. El ensayo de la actividad lacasa con ABTS se realizó según Wolfenden y Willson (1982). El coeficiente de extinción molar del producto (radical catiónico del ABTS) es $\epsilon_0 = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El ensayo consiste en medir el cambio de absorbancia de la mezcla de reacción, a una longitud de onda de 436 nm, durante 1 minuto. La mezcla de reacción se preparó mezclando partes iguales de la muestra y de una solución de ABTS 0,1 M en tampón acetato 0,1 M pH 5,2.

Para medir la actividad lacasa con el sustrato 2,6-dimetoxifenol ($\epsilon_0 = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se siguió el método propuesto por Shuttleworth y col., 1986. Se basa en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol en ausencia de peróxido de hidrógeno. Se realizó preparando una mezcla 1:1 (vol/vol) con la muestra y el 2,6-dimetoxifenol que se diluye en tampón acetato 0,1M pH 5 hasta una concentración

final de 1 mM en la mezcla de reacción. Se cuantificó la variación de absorbancia a una longitud de onda de 468 nm durante 1 min.

2.5.2. Actividad lignina-peroxidasa.

La actividad lignina peroxidasa se determinó según el método descrito por Tien y Kirk (1984), que se basa en la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído en presencia de H_2O_2 . La mezcla de reacción contiene una concentración final de tampón tartrato (pH 3,0) de 100 mM; alcohol veratrílico 2 mM y H_2O_2 0,4 mM. El incremento de absorbancia se mide a una longitud de onda de 310 nm durante 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del veratraldehído en estas condiciones es de $\epsilon_0 = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.5.3. Actividad manganeso-peroxidasa.

Para medir la actividad manganeso peroxidasa se siguió el método descrito por Pick y Keisare (1980) con algunas modificaciones. Se utilizó como sustrato el rojo fenol y la mezcla de reacción fue la siguiente: tampón tartrato 100 mM (pH 5,0); H_2O_2 0,1 mM; $MnSO_4$ 0,1 mM y rojo fenol 0,01% (p/v). Estos reactivos se mezclan con la muestra y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se detiene por la adición de 50 μl de NaOH 4 N por ml de reacción. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 610 nm. El coeficiente de extinción molar del producto oxidado en estas condiciones es de $\epsilon_0 = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.6. Concentración de caldos enzimáticos.

Como paso previo a la medición espectrofotométrica de la actividad lacasa de las levaduras transformadas, primeramente se filtró el caldo enzimático mediante un kitasato conectado a una bomba de vacío y con un filtro de 45 μm . Este filtrado se concentró mediante su centrifugación durante 30 minutos a 8000 rpm y 4°C, en filtros Millipore Ultrafree-15 con membrana Biomax de 10 KDa hasta el volumen deseado.

2.7. Zimogramas de actividad lacasa.

La zimografía es la técnica mediante la cual se realiza una separación electroforética de las proteínas, en condiciones nativas, y se revela el gel con un sustrato específico para la actividad enzimática en estudio. El sustrato utilizado para revelar los zimogramas de lacasa fue el 2,6-dimetoxifenol, que al oxidarse por la acción de la enzima da un color naranja.

La separación electroforética de proteínas se realizó de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970) en cubetas Mini-Protean (Bio-Rad). Los geles constaban de un gel separador y un gel concentrador, a partir de una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida. La acrilamida se utilizó a una concentración final de 12% en el caso del gel separador y del 5% en el concentrador. Se cargaron, en todos los casos, 20 μl de muestra procedente de los sobrenadantes de los cultivos líquidos junto con 5 μl de tampón de carga y se utilizó un marcador preteñido para SDS-PAGE de

Bio-Rad, que comprende un rango de peso molecular de 7,6 a 216 kDa. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V, hasta que el frente formado por la migración del bromofenol azul del tampón de carga alcanzó el extremo inferior del gel.

Una vez terminada la electroforesis, el gel fue equilibrado en tampón acetato 0,1 M pH 5,2 durante 30 minutos y se tiñó con una solución de 2,6-dimetoxifenol 10 mM en tampón acetato 0,1 M pH 5,2 hasta que aparecieron las bandas de color naranja correspondientes a la actividad lacasa en presencia de este sustrato.

2.8. Isoelectroenfoque (IFE).

El isoelectroenfoque se realizó con el equipo Mini IEF Cell 111 (Bio-Rad), utilizando un gel preparado de la siguiente manera: agua destilada 4,5 ml, anfolitos pH 2-4 (Serva) 200 μ l, 3 ml de acrilamida-bisacrilamida, 2 ml de glicerol (25%), 70 μ l de persulfato de amonio y 20 μ l de TEMED. Se dejó polimerizar durante 30 minutos, posteriormente se aplicaron sobre este gel las muestras contenidas en fragmentos de los geles de poliacrilamida de los zimogramas.

El isoelectroenfoque se desarrolló en las siguientes etapas:

15 minutos	100 V
15 minutos	200 V
30 minutos	400 V

El revelado se realizó mediante tinción con el sustrato 2,6-dimetoxifenol, de modo análogo al descrito para los zimogramas.

2.9. Decoloración del efluente con caldos enzimáticos.

Se estudió la decoloración del efluente, a partir del tratamiento con caldos enzimáticos obtenidos de cultivos de *Coriopsis gallica* en medio Kirk con ácido tánico (hasta concentración final de 100 μ M) como inductor de la actividad lacasa (apartado 2.4.1.2.4. de Materiales y Métodos). Para obtener los caldos se eliminaron los restos de micelio, filtrando los sobrenadantes de los cultivos a través de filtros Miracloth. Para asegurar que en el caldo no quedaba ningún micelio, estos caldos fueron a su vez filtrados por membranas con poro de 0,22 μ m.

Para realizar los estudios de decoloración del efluente se midió la actividad lacasa de este caldo, y se prepararon mezclas de 10 ml de volumen final, con la cantidad necesaria para tener 1 unidad de actividad lacasa y el efluente a una concentración del 20%. Las mezclas se colocaron en tubos Falcon de 50 ml, que se incubaron a 37 °C en agitación (200 r.p.m.). Además se prepararon controles con la misma composición a la de las mezclas en estudio, que se hirvieron durante 10 minutos para inactivar las enzimas y se incubaron en las mismas condiciones.

Se monitoreó el cambio de color asociado a la degradación enzimática del efluente, a través de medición de las unidades de color, tal y como se describe en el apartado 2.1.1.3. de Materiales y

Métodos. También se midieron los cambios en el espectro de absorción de las muestras en el rango de longitudes de onda entre 300 y 800 nm.

2.10. Técnicas de Biología Molecular.

Entre las técnicas de biología molecular que se describen a continuación no aparecen detalladas la preparación de soluciones, ni las digestiones de ADN con enzimas endonucleasas de restricción, (casa comercial Roche) que se realizaron básicamente según los métodos descritos por Sambrook y col., (1989).

2.10.1. Obtención y purificación de ácidos nucleicos.

2.10.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico de Hongos.

El ADN genómico de los hongos se extrajo a partir del micelio separado del medio de cultivo mediante su filtración a través de papel Miracloth. Este micelio fue lavado repetidas veces con agua destilada estéril y congelado rápidamente con nitrógeno líquido y guardado a -70°C para su posterior liofilización. Una vez liofilizado, el micelio fue triturado con varillas de vidrio estériles hasta convertirlo en un polvo fino. El ADN se obtuvo siguiendo el protocolo de Gómez-Pardo y Peñalva (1990). La calidad del ADN fue chequeada en geles de agarosa (0,7%) que se tiñeron con bromuro de etidio. La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN.

2.10.1.2. Extracción y purificación de ARN total.

2.10.1.2.1. Extracción de ARN de hongos.

Para la extracción del ARN total de hongos se utilizó el kit "Fast RNA Kit-Red", siguiendo las indicaciones del fabricante (BIO-101, USA). El ARN se extrajo a partir del micelio congelado a -70°C o a partir del micelio liofilizado.

La calidad del ARN se verificó mediante un gel de agarosa (0,8%), teñido con bromuro de etidio y su concentración se estimó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que una unidad de absorbancia es equivalente a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN.

2.10.1.2.2. Extracción de ARN de levaduras.

La extracción de ARN de levaduras se realizó utilizando el mismo kit (Fast RNA Kit-Red) y protocolo usado para los hongos filamentosos. El ARN se obtuvo a partir de cultivos en medios mínimos líquidos, después de 48 h de incubación, en agitación, a una temperatura de 30°C . Las levaduras fueron recogidas mediante centrifugación a 12000 rpm durante 4 min, y lavadas repetidas veces con agua destilada estéril, para eliminar los restos de medio de cultivo.

2.10.1.3. Extracción de ADN plasmídico.

2.10.1.3.1. ADN plasmídico de bacterias.

Para la extracción a pequeña escala de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial “High Plasmid Purification Kit” de Roche. Las muestras fueron obtenidas a partir del crecimiento, durante 16 h a 37°C, de la estirpe que contenía el plásmido de interés, en aproximadamente 6 ml de medio LB al que se añadió el antibiótico de selección adecuado. A continuación las células fueron recolectadas por centrifugación (30 segundos a 12000 rpm) y se procedió a la extracción del plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido de esta manera es adecuado para análisis de restricción y secuenciación.

La extracción a gran escala, utilizada principalmente para análisis de restricción, se realizó según el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979). Las muestras fueron preparadas de la misma manera que en la extracción a pequeña escala.

2.10.1.3.2. ADN plasmídico de levaduras.

La extracción del vector de expresión, utilizado para la transformación de las levaduras, se realizó según el método de Hoffman y Wriston (1987). Este método permite la obtención de ADN total para análisis “Southern” y de ADN plasmídico. Las levaduras fueron crecidas en medios mínimos durante toda la noche a 30°C, en agitación. Transcurrido este tiempo, las células fueron recogidas por centrifugación y se procedió a su ruptura mediante perlas de vidrio de 0,45 µm de diámetro y buffer de ruptura celular. A continuación se siguieron los pasos de fenolización, precipitación y lavados del método. La cantidad de ADN total que se recupera se estima en 2-4 µg, y aunque existe degradación mecánica del ADN, este método permite observar en Southern fragmentos de restricción de 12 Kb.

2.10.2. Purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN de interés se separaron a partir de geles de agarosa de concentración adecuada (desde 0,5 a 2% de agarosa) según el tamaño del fragmento en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM, pH 8), y se identificaron mediante tinción con bromuro de etidio por comparación con la movilidad electroforética de los marcadores de peso molecular comerciales “Marker X” y “λ-Hind III” (Roche).

Para la purificación de estos fragmentos se utilizó el sistema “Ultra Clean DNA Purification Kit” de la casa comercial MOBIO (USA). Se cortó el fragmento de gel que contenía la banda a purificar y se procedió siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.10.3. Purificación de ARNm a partir de ARN total.

Para la realización de los estudios de expresión del gen de lacasa *cglcc1* de *Corioloropsis gallica* en medios que contenían efluente, fue necesario hacer la purificación del ARN mensajero (ARNm). Esto fue debido a que cuando se aísla ARN total a partir de cultivos con efluente, este presenta polifenoles que pueden inactivar las enzimas utilizadas en las reacciones de transcripción reversa y PCR. La purificación del ARNm se realizó mediante el aislamiento de las moléculas con extremos

poliadenilados (“colas de polyA”), utilizando el kit “mRNA Capture Kit” de la casa comercial Roche. El ARN total fue extraído como se describe en el apartado 2.10.1.2. y a continuación se procedió a la purificación siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.10.4. Reacción de la transcriptasa reversa (RT).

Mediante esta reacción se sintetiza la primera cadena de ADN complementario (ADNc), utilizando como molde ARN total o, en el caso de las muestras con efluente, el ARNm purificado como se describe en el apartado anterior.

Para la reacción se utilizó 1 µg de ARN total, 4 µl de hexámeros cebadores y agua desionizada estéril hasta completar 9,8 µl. Esta mezcla fue incubada a 65°C para desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo durante 5 minutos. A continuación se añadieron 10,2 µl de la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de tampón 10x para la transcriptasa reversa (Roche), MgCl₂ 5 mM, desoxinucleótidos trifosfato a concentración final de 1mM, 50 unidades de inhibidor de RNAsa y 20 unidades de transcriptasa reversa del Virus de la Mieloblastosis de Aves (AMV reverse transcriptase, Roche).

La mezcla fue incubada a 42°C durante una hora, y la reacción se detuvo calentando a 99°C durante 5 minutos. A continuación se colocó en hielo durante 5 minutos para ser usada inmediatamente o se almacenó a – 20°C para posteriores utilizaciones.

2.10.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron las enzimas Taq DNA polimerasa de la casa comercial Pelkin Elmer o la Klen Taq polimerasa de la casa comercial Clontech.

La preparación de las mezclas de reacción utilizadas se realizó de acuerdo con las instrucciones descritas por los fabricantes. Como norma general estas mezclas suelen contener:

ADNmolde	variable
tampón 10x	5 µl
MgCl ₂ 25 mM*	7µl
dNTPs 10 mM	1 µl
cebador corriente arriba (20pM)	1 µl
cebador corriente abajo (20pM)	1 µl
enzima polimerasa	0,5 µl (2,5 unidades)
H ₂ O desionizada estéril	variable
Volumen Total	50 µl

* Cuando se utiliza la enzima de Clontech no se añade MgCl₂ pues está incluido en el tampón de reacción comercial

El ADNmolde que se utilizó depende de cada experimento realizado. Se utilizó ADNc sintetizado por la reacción de la transcriptasa reversa (hasta 5 µl del producto de reacción), ADN

genómico total (200 ng), o fragmentos de ADN clonados en vectores de expresión (desde 0,01 pg hasta 1 ng). El termociclador utilizado fue del modelo “Rapidcycler” de Idaho Technology, USA.

El procedimiento para realizar la PCR es igual en todos los casos y consta de los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos.
- Realización de 20 a 30 ciclos de amplificación (dependiendo de la concentración del molde a amplificar) constituidos por las siguientes fases:

Desnaturalización	94°C	45 segundos
Anillamiento*	variable	45 segundos
Elongación	72°C	2 minutos

* La temperatura de anillamiento va a depender de los cebadores utilizados en cada caso

- Elongación final durante 7 minutos a 72°C una vez concluido el total de los ciclos para completar la síntesis de productos que quedaron incompletos durante los ciclos previos.

Terminada la PCR la reacción se coloca en hielo si va a ser utilizada inmediatamente o se almacena a - 20°C para posteriores usos.

2.10.6. Clonaje de productos de PCR.

El clonaje de productos de PCR se realizó mediante el kit “pGEM-T Vector System” (Promega) que permite el clonaje en el vector pGEM-T, especialmente diseñado para los productos de PCR.

2.10.7. Síntesis del ADNc del gen de lacasa *cglc1*.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de ARN extraído de micelio aislado de un cultivo líquido con alta actividad lacasa.

En la reacción de PCR para sintetizar la segunda cadena y amplificar los ADNc sintetizados mediante la reacción de la transcriptasa reversa (según metodología del apartado anterior 2.10.5) se utilizaron cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del gen que codifica para el gen de lacasa (*cglc1*) de *Coriopsis gallica*. Estos cebadores fueron diseñados tomando como referencia la secuencia del ADN genómico del gen *cglc1*, publicada en el Gen Bank con el número de acceso AY017340. A estos cebadores se les unió una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Bgl* II, de manera que el fragmento de ADN amplificado pudiera ser clonado en el vector de expresión pYES 2.

La secuencia de estos cebadores fue la siguiente:

Cebador corriente arriba: *lcc5* 5'-GAAGATCTTCATGCTGCACACTCGCACTCG-3'

Cebador corriente abajo: *lcc3* 5'-GAAGATCTTCGGGTTCTCCGCGTAGTAGGTCGG-3'

En negrilla aparecen marcadas las secuencias de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Bgl* II. La temperatura de anillamiento utilizada en la reacción de PCR con estos cebadores fue de 60°C.

2.10.8. Métodos de transformación.

2.10.8.1. Transformación de bacterias.

Se prepararon células competentes de *Escherichia coli* DH5 α siguiendo el método descrito por Hanahan (1983). Las células de *E. coli* competentes (100 μ l) se descongelaron en hielo y se añadió el plásmido a transformar, dejándose la mezcla en hielo unos 20 minutos. La entrada del plásmido en la célula se induce mediante un choque térmico producido por la incubación a 37°C durante 5 minutos y el posterior enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Las células, ya transformadas, se incuban durante 1 hora a 37°C en 1 ml de medio SOB (apartado 2.3.3.2.), para permitir la recuperación de estas y la replicación del plásmido transformado. Finalmente, se recuperan las células mediante centrifugación a 12000 rpm durante 30 segundos y se plaquean en medio LB con ampicilina (apartado 2.3.3.1.). Cuando se selecciona además por pérdida de la actividad β -galactosidasa, se incluye en el medio X-gal e IPTG.

2.10.8.2. Transformación de levaduras.

Para la preparación de células competentes de levaduras y su transformación se utilizaron dos protocolos distintos. Por un lado el método descrito por Elble (1992), más rápido y sencillo, pero con menos eficiencia de transformación y el protocolo de transformación de levaduras por choque térmico y acetato de litio, con más alta eficiencia de transformación (Ito y col., 1983; Schiestl y col., 1989).

En ambos métodos, las levaduras fueron crecidas durante toda la noche en medio completo a 30°C, en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm de 0,8-1 U. Para la transformación se utilizó aproximadamente 1 μ g de ADN plasmídico y ADN "carrier" procedente de esperma de salmón sonificado, que fue previamente desnaturalizado durante 5 minutos a 100°C. Los dos métodos utilizan una mezcla de Polietilenglicol (PEG 4000) 40%, LiAc 0,1 M y TE 1X, pH 7,5, para hacer a las células competentes, es decir susceptibles a la entrada del plásmido, más un choque térmico a 42°C.

La sencillez y rapidez del método de Elble radica en que no hay tantos lavados y preparación de las células de levadura, antes de transformarlas, como ocurre en el otro protocolo.

Las células recién transformadas son plaqueadas en medio mínimo de levaduras (apartado 2.3.2.2.) con los aminoácidos correspondientes a la auxotrofia de la levadura, excepto el

aminoácido que lleve el vector de expresión como marcador, así seleccionamos a aquellas levaduras que hayan sido transformadas.

2.10.9. Secuenciación automática del ADN.

La secuenciación automática del ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid.

2.10.10. Análisis de las secuencias de ADN.

La consulta de secuencias se realizó en las bases de datos GeneBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) y EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania), con las siguientes direcciones electrónicas: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y <http://www.ebi.ac.uk>.

El análisis informático de las secuencias se realizó con los programas ALIGN, BESTFIT y BLAST, integrados en el macroprograma "GCG Wisconsin" desarrollado por Devereux y colaboradores (1984).

3.1. Caracterización del efluente de la industria cervecera.

3.1.1. Caracterización preliminar del efluente.

Como ya se mencionó en la introducción (apartado 1.1.3.), el efluente objeto de este estudio procede de la regeneración, con NaOH, de los filtros de polivinilpolipirrolidona (PVPP) a través de los cuales se hace pasar la cerveza para su estabilización coloidal, proceso denominado clarificación de la cerveza. Este efluente fue recogido de un ciclo de filtración de 5009 HI de cerveza y presenta un color marrón oscuro y con las siguientes características físico-químicas:

pH básico:	13,6
Unidades de Color:	71538 \pm 3525
DQO:	29,88 \pm 2,3 g/L

Tras la centrifugación de distintas muestras del efluente no aparecieron sólidos en suspensión, ni tampoco cuando éste fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 110°C. En estas mismas muestras se llevó a cabo el análisis de los fenoles totales, fenoles no tánicos y taninos que dio como resultado los siguientes valores:

Fenoles	Concentración (g/L)	Desviación estandar
Totales	1,50	0,05
No Tánicos	0,40	0,01
Taninos	1,08	0,06

3.1.2. Condiciones óptimas de esterilización y pH.

Como paso previo al biotratamiento del efluente con el hongo, se realizaron estudios para determinar las condiciones óptimas de esterilización del efluente, teniendo en cuenta que éste no debía precipitar o variar su color. El efluente no varío su color, ni experimentó ninguna precipitación al ser esterilizado sólo, ni tampoco cuando era esterilizado junto con el resto de los componentes de los distintos medios de cultivo. Así mismo, se comprobó que dentro de un rango de pH comprendido entre 4,00 y 7,00 el efluente alcalino no experimentaba ninguna alteración de precipitación, ni cambio de color. Por debajo de pH 3 tenía lugar una precipitación de algunos de los componentes del efluente que modificaron el color del mismo.

3.1.3. Análisis por espectroscopía de absorción infrarroja.

El análisis mediante espectroscopía infrarroja es una técnica conservativa en la que la muestra es analizada sin ningún tratamiento previo que la altere. Es un método analítico que aporta datos generales acerca de la composición de las muestras. La información que dan las bandas, a distintas

frecuencias, es a menudo asignable a tipos de enlace que pueden corresponder a más de una clase de molécula, por lo que los datos aportados deben ser siempre interpretados con cautela, y ser complementados con otras técnicas analíticas.

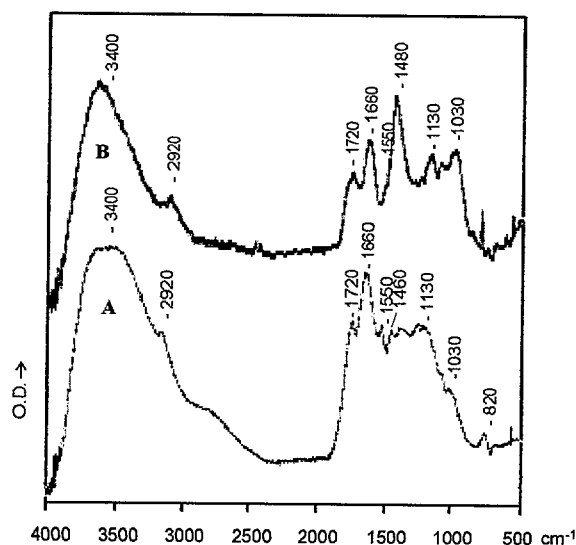


Figura 4: Espectros infrarrojos (IR) de la fracción precipitada del efluente (A) y de la fracción correspondiente al sobrenadante del efluente (B).

En el apartado 2.1.2. de Materiales y Métodos se explicó como se prepararon las diferentes fracciones del efluente, que se analizaron por espectroscopía de IR, y que fueron: precipitado del efluente por acidificación y sobrenadante del mismo. Las asignaciones de las principales bandas de absorción en los espectros que corresponden a las diferentes estructuras de las moléculas de carbohidratos, lípidos, proteínas y otros compuestos se hicieron de acuerdo con los datos publicados en la bibliografía (Bellamy, 1961; Nakanishi, 1962).

En la figura 4 se muestran los espectros de IR de estas dos muestras que presentaron perfiles muy similares entre sí. A continuación se describen las principales bandas de absorbancia detectadas en ellas (Tabla 4) y las diferencias existentes.

Tabla 4: Asignaciones de las principales bandas de los espectros infrarrojos de la fracción precipitada con ácido del efluente, y de la fracción soluble.

Frecuencia cm^{-1}	Asignación
3400	Tensión O-H en grupos que forman puentes de H
2920	Tensión C-H alifática
1720	Tensión C=O de grupos carboxilo
1660	Tensión C=O en amidas (amidas I)
1550	Flexión N-H en amidas (amidas II)
1422-1366	$\nu(\text{C-OH})$ en fenoles
1460	Deformación C-H alifática
1130	$\delta(\text{C-H})$ en plano
1030	Tensión de grupos OH alcohólicos
820	Grupos C-H aromáticos

La banda ancha a 3400 cm^{-1} , que puede ser atribuida a grupos OH, aparece con intensidad similar en las dos muestras del efluente: la precipitada con ácido (que corresponde a una fracción

de alto peso molecular), y la fracción sobrenadante, que corresponde a los constituyentes solubles del efluente (compuestos de bajo peso molecular). La banda a 2920 cm^{-1} , producida por la tensión C-H alifática, aparece muy tenue en ambas muestras. El hombro a 1720 cm^{-1} , correspondiente a tensión C=O en grupos carboxilo, aparece claramente definido en ambas muestras, siendo más fuerte en la fracción soluble. Las dos bandas claras de amidas I (1660 cm^{-1}) y amidas II (1550 cm^{-1}) que indican la presencia de proteínas en la fracción precipitada del efluente, junto con las bandas atribuibles a la presencia de sustancias fenólicas, (picos a 820 cm^{-1} asignados a grupos C-H aromáticos), indican la posible presencia de complejos proteínas-taninos en la fracción de alto peso molecular del efluente precipitada con el ácido. La presencia de proteínas, concretamente de algunos aminoácidos, y de compuestos fenólicos procedentes de taninos, es sugerida también por algunos productos de pirólisis de esta misma muestra del efluente como se describe en el apartado 3.1.4. de Resultados. La propiedad de los taninos de unirse a proteínas y a otros compuestos mediante enlaces de tipo fuerte ha sido ampliamente descrita (Hagerman y Butler, 1981; Wettstein, 1993; Reed, 1995).

En la muestra correspondiente a la fracción soluble del efluente se puede observar una banda intensa de grupos aromáticos sustituidos, frecuente en fenoles, situada en torno a los 1480 cm^{-1} , que no se detectó en la fracción de alto peso molecular y que puede ser atribuida a los fenoles de bajo peso molecular procedentes de los taninos. Las bandas a 1030 cm^{-1} debidas a grupos OH alcohólicos se observaron en ambas muestras pero con mayor intensidad en la fracción soluble del efluente y pueden atribuirse a carbohidratos que no han sido fermentados durante el proceso de fabricación de la cerveza. La presencia de bandas de proteína, carbohidratos y lípidos, no permiten descartar la presencia de trazas de biomasa de levaduras en este efluente, sobre todo en la fracción de alto peso molecular.

3.1.4. Pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM).

La técnica de pirólisis, acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (Pi-CG-EM) ha mostrado ser una técnica rápida y útil para la caracterización de un gran número de macromoléculas naturales y sintéticas. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el análisis de gran variedad de compuestos tales como ácidos húmicos (Schulten y Schnitzer, 1993; Almendros y col., 1997; Fabbri y col., 1998), ligninas de diversos orígenes (Ralph y Hatfield, 1991; Fidalgo y col., 1993; Terrón y col., 1993a), carbohidratos (Pouwels y col., 1989) y diferentes sustratos lignocelulósicos degradados por hongos ligninolíticos (Calvo y col., 1995; Terrón y col., 1993b, 1995). Es una técnica destructiva de gran interés para el estudio de las macromoléculas de alto peso molecular, en general, que permite caracterizar los diferentes compuestos a partir de sus pirogramas típicos, o a través de la presencia de productos de pirólisis específicos, que pueden correlacionarse con una determinada estructura química. Para ello se requiere de poca cantidad de

muestra, y ofrece simultáneamente datos de diferentes clases de compuestos como azúcares, derivados fenólicos, proteínas, etc.

La identificación de los productos de pirólisis se basó en la interpretación de sus espectros de masas y en la comparación con los registrados en la librería "National Bureau of Standard" (NBS) y con los datos de Pi-CG-EM publicados en la bibliografía (Pouwels y col., 1989; Ralph y Hatfield, 1991). Los productos más volátiles que eluyen por debajo del scan 200 no fueron considerados, ya que la mayor parte de ellos representan los fragmentos más pequeños (peso molecular < 80) que se obtienen mediante pirólisis y no son indicadores diagnósticos de ningún tipo de macromolécula en concreto. La preparación de las muestras del efluente se realizó como se explica en el apartado 2.1.3. de Materiales y Métodos, y la fracción precipitada, mediante la acidificación del mismo, fue la que se utilizó para este tipo de análisis. En la Tabla 5 se muestran los distintos compuestos identificados, así como sus áreas relativas.

Tabla 5: Productos de pirólisis de la fracción precipitada del efluente.

Nº*	Nombre	Origen**	Scan	PM	Área Relativa***
					Precipitado del Efluente
1	Metilpirrol	P	213	81	1,31
2	Estireno (Vinilbenceno)	P	292	104	0,81
3	Fenol	Lig/P	612	94	22,6
4	3-Metilfenol	Lig/P	866	108	1,23
5	4-Metilfenol	Lig/P	929	108	10,84
6	Guaiacol	Lig	935	124	18,67
7	4-Etilfenol	Lig	1154	122	2,3
8	4-Metilguaiacol	Lig/P	1188	138	3,17
9	4-Vinilfenol+ Catecol	Lig	1278	230	6,27
10	4-Etilguaiacol	Lig	1361	152	1,53
11	Indol	P	1391	117	1,92
12	4-Vinilguaiacol	Lig/AF	1426	150	9,88
13	2,6-Dimetoxifenol (Siringol)	Lig	1496	152	0,84
14	Eugenol	Lig	1500	164	0,95
15	Acid. Decanoico	Lp	1833	172	2,63
16	Acid. Mirístico	Lp	2105	228	7,25
17	Acid. Palmítico	Lp	2354	256	6,01

* En todos los análisis realizados por Pi-CG-EM, cada compuesto se designó siempre con un mismo número, para mantener la homogeneidad en cuanto a la numeración.

** P=Proteína; Lig= Lignina; AF=Ácido férulico; Lp=Lípidos

*** Área relativa. Las diferencias respecto al 100% se deben a la presencia de compuestos desconocidos o minoritarios.

Los principales grupos de productos, derivados de la pirólisis de esta fracción precipitada del efluente, fueron los siguientes: Derivados fenólicos: 58%; Derivados de aminoácidos: 31%; Derivados de lípidos: 11%. Estos valores se calcularon mediante la suma de las áreas relativas teniendo en cuenta que hay productos que pueden ser derivados tanto de aminoácidos como de fenoles.

Dentro del grupo de compuestos derivados de fenoles, los productos mayoritarios detectados fueron: fenol (3), 4-metilfenol (5), guaiacol (6) y 4-vinilguaiacol (12) (Tabla 5). Otros picos importantes correspondieron a los producidos por la coelución de 4-vinilfenol y catecol (9) y 4-metilguaiacol (8). Todos estos compuestos se han descrito tanto, como productos típicos de la pirólisis de taninos, como derivados de la pirólisis de lignina, paja y madera (Ralph y Hatfield, 1991; Terrón y col., 1996). Esto es un resultado esperado porque la lignina y los taninos comparten una serie de características estructurales comunes de polifenoles (William y col., 1986). Los compuestos como fenol (3), 4-metilfenol (5), guaiacol (6) y catecol (9), han sido descritos como productos de pirólisis en granos de cebada (*Hordeum vulgare*) (Galletti y Reeves, 1992). Los principales compuestos fenólicos, identificados en la bibliografía, procedentes de muestras cerveza son: catequina, epicatequina, procianidina B3, prodelfinidina B3 y ácido ferúlico (Cortacero y col., 2003). A su vez, el fenol (3), guaiacol (6), catecol (9) y 2,6-dimetoxifenol (13) han sido descritos como derivados típicos de taninos presentes en muestras de vino, que pueden ser atribuidos a la presencia de pelargonidina, peonidina, cianidina y malvidina, respectivamente, en la sustancia tánica original. Por otro lado la ruptura del anillo heterocíclico de estos taninos, produce cantidades relativamente más pequeñas de 4-metilfenol (5), 4-etilfenol (7), 4-vinilfenol (9), 4-metilguaiacol (8) y 4-metilcatecol (Galletti y col., 1995). Todos estos compuestos, salvo el 4-metilcatecol, estaban presentes en la muestra precipitada de nuestro efluente.

Entre los derivados de aminoácidos se detectaron los siguientes productos de pirólisis: metilpirrol (1), estireno (2), indol (11) y los compuestos, fenol (3), 3-metilfenol (4), 4-metilfenol (5), 4-metilguaiacol (8) que pueden ser atribuidos tanto a fenoles como a proteínas. El alto porcentaje de compuestos derivados de aminoácidos, en esta fracción del efluente, puede ser debido a que los taninos, presentes en el mismo, presentan una elevada capacidad para formar fuertes complejos con proteínas (Hagerman y Butler, 1981; Wettstein, 1993; Reed, 1995). El fenol (3) y metilfenol (4) han sido descritos como productos de pirólisis del aminoácido tirosina, el indol (11) del triptófano, y el estireno (2) de la fenilalanina (Chiavari y Galletti, 1992; Stankiewicz y col., 1997). Estos aminoácidos fueron determinados en muestras de cerveza (Cortacero y col., 2003).

El ácido decanoico (15), mirístico (16) y palmítico (17) conforman el grupo de productos de pirólisis derivados de los lípidos (Fabbri y col., 1998). Se conoce que las semillas contienen grasas y que los taninos también son originarios de las semillas. Es por lo tanto posible que los taninos presentes en el efluente, atrapen los ácidos grasos en su forma libre o como triglicéridos o son esterificados con ácidos grasos, produciendo un efecto importante sobre las propiedades del tanino tales como la astringencia.

3.2. Estudios de decoloración del efluente con el basidiomiceto *Coriolopsis gallica*.

3.2.1. Ensayos cualitativos de decoloración en medios sólidos.

El hongo basidiomiceto de podredumbre blanca *Coriolopsis gallica* fue seleccionado en nuestro laboratorio, entre diferentes especies de basidiomicetos, por su capacidad para decolorar efluentes procedentes de la industria papelera, siendo aplicado, con éxito, en el biotratamiento y en la decoloración de estos efluentes (Calvo y col., 1998; Zapico, 1999). Este hongo también mostró capacidad para degradar colorantes empleados en la industria textil (Pickard y col., 1999; Téllez y col., 2001). Carbajo y colaboradores (2002), estudiaron el efecto del ácido tánico, como posible inductor de la producción de la actividad lacasa en *Coriolopsis gallica*, cuyos resultados revelaron un aumento evidente de los niveles de lacasa extracelular y de los niveles de transcritos de la misma en presencia del ácido tánico. Esto resulta interesante a la hora de trabajar con este efluente, que como se ha visto anteriormente contiene, principalmente compuestos polifenólicos, entre ellos taninos.

Este conjunto de resultados nos llevó a elegir a este hongo para realizar el estudio de la decoloración de este tipo de efluente de la industria cervecera, bien sea, utilizando el hongo como parte de un sistema de tratamiento, o utilizando la lacasa producida por medio de su expresión heteróloga en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que ofrece como velos agregado la facilidad de participar activamente en el proceso de fabricación de la cerveza. Este tipo de estudios, además, permitirá profundizar en aspectos fisiológicos y moleculares de la degradación mediada por enzimas ligninolíticas, que a pesar de haber sido intensamente estudiada, aún dista mucho de ser plenamente comprendida.

3.2.1.1. Comparación de la capacidad de crecimiento y decoloración del efluente con otros basidiomicetos, en diferentes medios de cultivo.

En un primer estudio de la capacidad de *Coriolopsis gallica*, tanto de crecer como de decolorar el efluente de la industria cervecera, se realizaron diferentes ensayos cualitativos en medios sólidos. Como controles positivos de la decoloración se utilizaron dos especies de basidiomicetos: *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes* sp. I-62.

Phanerochaete chrysosporium es el organismo utilizado, con mayor frecuencia, como modelo en los estudios de degradación de la lignina y junto con las especies del género *Trametes* son los hongos basidiomicetos mejor estudiados desde la bioquímica y la biología molecular. Ambos hongos han demostrado, además, gran capacidad de degradación de una amplia variedad de compuestos y un gran potencial para aplicaciones industriales. *P. chrysosporium*, al presentar dos estados: sexual y asexual, en cultivo puro, ha permitido el avance en el estudio de su genética, y se han utilizado las técnicas de biología molecular en la expresión homóloga y heteróloga de sus

enzimas extracelulares. Por su parte, en *Trametes*, a pesar de que su estudio a nivel molecular no está tan desarrollado, también se han detectado familias de genes de peroxidasa y lacasas, y se han utilizado estas enzimas para diversos tratamientos de sustratos complejos.

El estudio comparativo de estos tres basidiomicetos se realizó en placas que contenían medio 7 y medio Kirk (sin alcohol veratrílico), con 20% de efluente industrial. El medio 7 es un medio más completo, con un alto contenido en nitrógeno, mientras que el medio Kirk es bajo en nitrógeno. Se

prepararon controles abióticos, no inoculados, y controles del crecimiento de las distintas cepas en medios sin efluente. El crecimiento, en mm, de las colonias fue medido diariamente con el fin de establecer un control de crecimiento micelial y la existencia o no de decoloración del efluente, así como el día de comienzo de la decoloración.

Phanerochaete chrysosporium fue la cepa que presentó mayor crecimiento tanto en los medios control, como en los medios con 20% de efluente. Su crecimiento fue más rápido en los medios controles que en los suplementados con efluente, siendo el medio 7 en el que mejor se desarrolló, produciendo un micelio mucho más denso y en menor tiempo (Fig. 5). Sin embargo, en los medios con efluente, su crecimiento fue más rápido en el medio Kirk en el cual al sexto día de incubación el micelio ya había cubierto toda la placa, además de ser en el único medio donde se produjo decoloración del efluente que comenzó en el día 8 de incubación (Fig. 6). En *Phanerochaete chrysosporium* la ligninolisis se activa en condiciones limitantes de nitrógeno, como es el medio

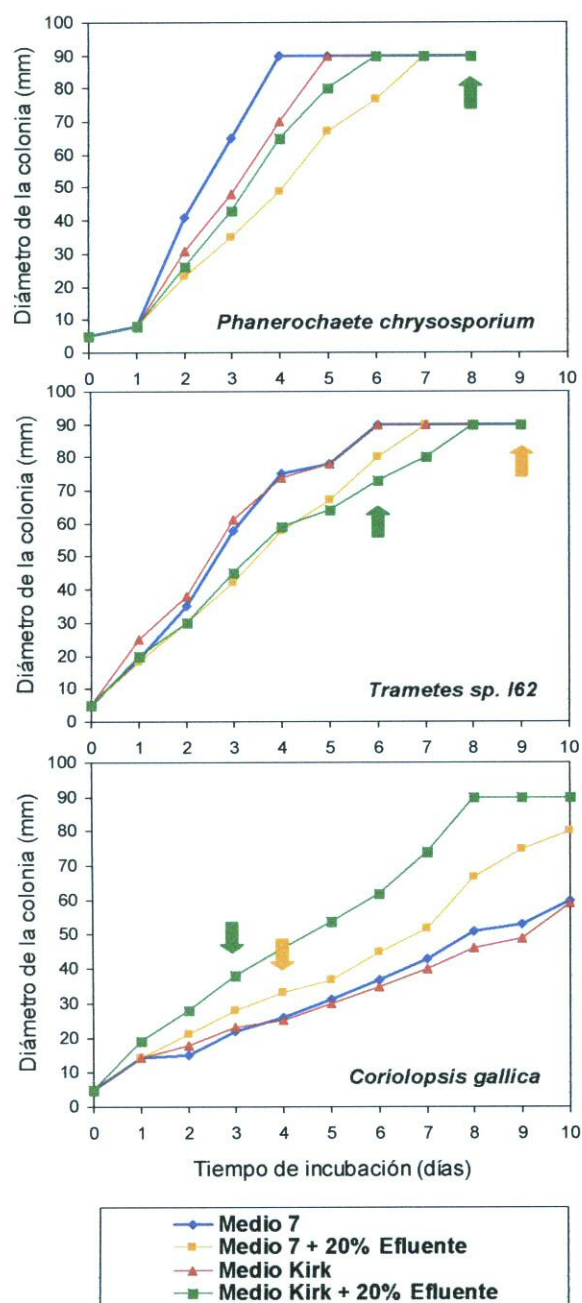


Figura 5: Capacidad de crecimiento y decoloración de tres especies de basidiomicetos en medios sólidos control y suplementados con 20% de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.

Kirk, durante la fase de metabolismo secundario (Keyser y col., 1978). Es probable que en este medio se activara el sistema enzimático que da lugar a la ligninólisis degradando los compuestos complejos responsables del color del efluente.

El basidiomiceto *Trametes* sp. I62 tuvo la misma capacidad de desarrollo tanto en medio Kirk como en medio 7, con y sin efluente, aunque con un crecimiento un poco más retardado en el medio Kirk, cuando este contenía efluente (Fig. 5). Sin embargo, la decoloración comenzó antes en el medio Kirk (día 6 de incubación), que en medio 7 que empezó a decolorar en el día 8. En la figura 6 se observa que en medio Kirk la decoloración del efluente fue mayor que la obtenida en medio 7. En medio Kirk el micelio presentó la característica de un halo de sobrecrecimiento justo por encima del halo de decoloración del efluente. Estudios realizados con esta cepa (Mansur, 1996; González, 2001, González y col., 2003a y b) han permitido detectar actividad lacasa en diferentes condiciones de cultivo.

A diferencia de los otros dos basidiomicetos, *Corioloopsis gallica* creció mucho mejor en medios suplementados con efluente que en los controles, y dentro de estos en el medio Kirk fue donde mejor se desarrolló, lo que puede indicar que la adición del efluente pudo estimular el crecimiento del hongo (Fig. 5).

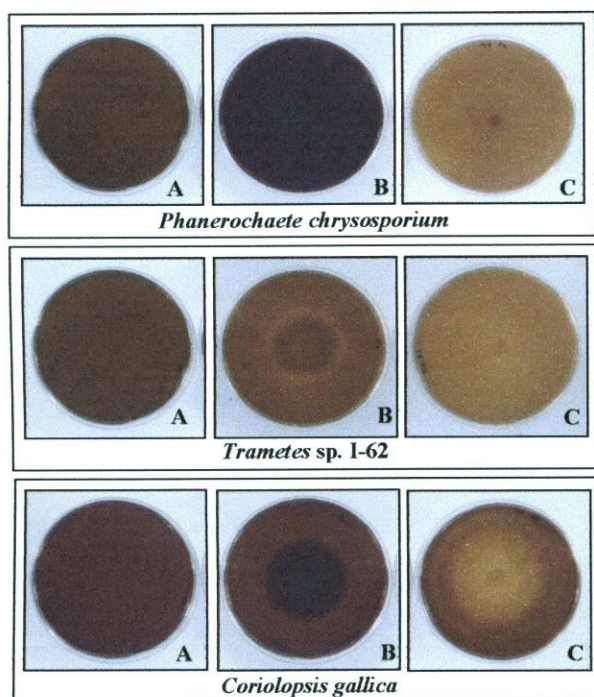


Figura 6: Decoloración producida por *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp. I-62 y *Corioloopsis gallica* en medios sólidos suplementados con 20% de efluente. A: Control abiótico; B: Medio 7; C: Medio Kirk (sin alcohol veratrílico). Tiempo de incubación: 14 días para *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes* sp. I-62, 8 días para *Corioloopsis gallica*. Temperatura de incubación: 28°C.

Mientras que en el medio 7 con efluente tardó 14 días en cubrir toda la placa de micelio, tan sólo fueron necesarios 8 días de incubación en el medio Kirk con efluente. La producción de micelio fue menos densa en el medio Kirk que en el medio 7, donde el crecimiento fue más lento y con un micelio más compacto.

La decoloración que produjo *C. gallica* fue muy temprana en ambos medios, siendo mucho más intensa en el medio Kirk (Fig. 6). En medio 7, la decoloración comenzó desde la periferia de la placa de cultivo hacia el centro de la misma, mientras que en el medio Kirk la decoloración se produjo desde la zona central hacia el exterior, exclusivamente donde existía micelio y fue avanzando esta decoloración con el

crecimiento del hongo. Puede que en el medio Kirk, el hongo necesitara de la degradación del efluente para poder desarrollarse, al ser este medio más limitado, originándose a la vez un halo de crecimiento y decoloración solapados. Sin embargo, en el medio 7 quizás al hongo no le fue tan necesario la degradación de los componentes del efluente para crecer, pues este medio es más completo, con lo cual primero se formó un halo de crecimiento de micelio y posteriormente el halo de decoloración que se desarrolló por la periferia del mismo, cuando los nutrientes del medio de cultivo fueron agotándose.

En los medios controles su desarrollo fue muy similar en ambos, con la salvedad de que en el medio Kirk se observó una producción de pigmentos.

En resumen, *Coriopsis gallica* mostró buena capacidad de crecer y decolorar estos medios que contenían efluente, ya que aunque presenta un crecimiento más lento, que los otros dos basidiomicetos, su decoloración fue mucho más adelantada y su desarrollo fue mucho mejor en los medios que fueron suplementados con efluente.

3.2.1.2. Temperatura óptima de decoloración.

Una vez comparada de manera cualitativa la capacidad de crecimiento y decoloración del efluente por *Coriopsis gallica* con otros dos basidiomicetos, se estudio el efecto que podría producir la temperatura de incubación en estas capacidades. Este estudio se realizó a las temperaturas de 28°C y 37°C tanto en medio Kirk (sin alcohol veratrílico) como en medio 7, suplementados con 20% de efluente. Como controles se utilizaron estos mismos medios sin la suplementación de efluente.

El crecimiento de *Coriopsis gallica* prácticamente no se vio afectado por la temperatura. El hongo tardó los mismos días en cubrir toda la placa de micelio a una temperatura de incubación de 28°C que a 37°C. Por el contrario, tanto en los medios control como en los suplementados con efluente la capacidad de decoloración observada a 37°C fue, en principio, algo mayor que a 28°C, si bien en el día 15 de incubación la decoloración producida fue prácticamente igual, a ambas temperaturas.

Cuando la temperatura de incubación fue de 37°C, el medio de cultivo se secó mucho más, produciendo una decoloración del medio, observada en las placas con efluente utilizadas como controles abióticos. Además, en el medio Kirk con efluente, *C. gallica* produjo pigmentos que aparecieron mucho antes y con mucha más intensidad a la temperatura de 37°C. La producción de estos pigmentos se presentó desde el centro de la colonia hacia la periferia siguiendo el crecimiento radial del micelio. Estos resultados obtenidos dificultan los estudios posteriores y como la

decoloración y el crecimiento no se ven drásticamente afectados por las diferencias de temperatura se optó por planificar los experimentos posteriores a 28°C.

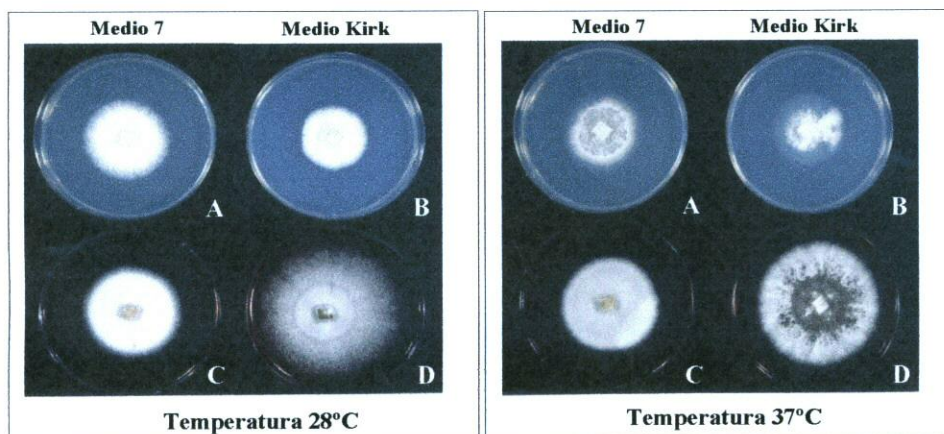


Figura 7: Diferencias en el crecimiento de *Coriopsis gallica* en diferentes temperaturas de incubación. Tiempo de incubación: 8 días. A: Medio 7 control; B: Medio Kirk control; C: Medio 7 con 20% efluente; D: Medio Kirk con 20% efluente.

3.2.1.3. Capacidad de crecimiento y decoloración en medios de cultivo con distintas concentraciones de efluente.

Después de comprobar que *C. gallica* era capaz de crecer en presencia de este efluente y de decolorarlo, se realizó un estudio de sus capacidades de crecimiento y decoloración a diferentes concentraciones del mismo. Las concentraciones utilizadas para este ensayo fueron de 20, 40, 60 y 80% de efluente. Así mismo, se probó a crecer el hongo en un 100% de efluente sólo y con la suplementación de los componentes del medio de cultivo con el fin de enriquecerlo, pero en ningún caso se observó crecimiento, por lo que la concentración más alta ensayada fue la de 80% de efluente.

Se ensayó, además, la influencia sobre el crecimiento y decoloración de *Coriopsis gallica* del compuesto alcohol veratrílico, el cual se ha descrito como un inductor de la actividad lacasa (Bollag y col., 1988; Mansur y col., 1998; Zapico, 1999; González, 2001; Arana-Cuenca y col., 2004) adicionándolo al medio Kirk.

Como se ha visto en los estudios anteriores, *Coriopsis gallica* se desarrolló de manera análoga tanto en el medio 7 como en el medio Kirk, cuando estos no presentan efluente. Sin embargo, al añadir, a estos medios, distintas concentraciones del efluente se observó que su crecimiento fue mayor en el medio con concentración limitante de nitrógeno (medio Kirk) que en el medio completo, como el medio 7 (Fig. 8).

En cuanto al crecimiento de este hongo en medio Kirk con y sin alcohol veratrílico control, sin efluente, resultó también similar sin observar influencias en el crecimiento por la adición de alcohol veratrílico. En estos medios *C. gallica* produjo pigmentos que comenzaron a aparecer al día 7 de incubación y que no se originaron en el medio 7 sin efluente. Sin embargo, cuando este medio 7 se suplementó con efluente se dio la formación de estas sustancias cromóforas. Se ha descrito la formación de sustancias cromóforas en el tratamiento de efluentes del pulpeo para la producción de papel, utilizando *Trametes versicolor*, y se ha sugerido que podría deberse a la actividad lacasa que genera quinonas y compuestos diméricos a partir de diferentes precursores que podrían estar presentes en el medio generando fenómenos de polimerización.

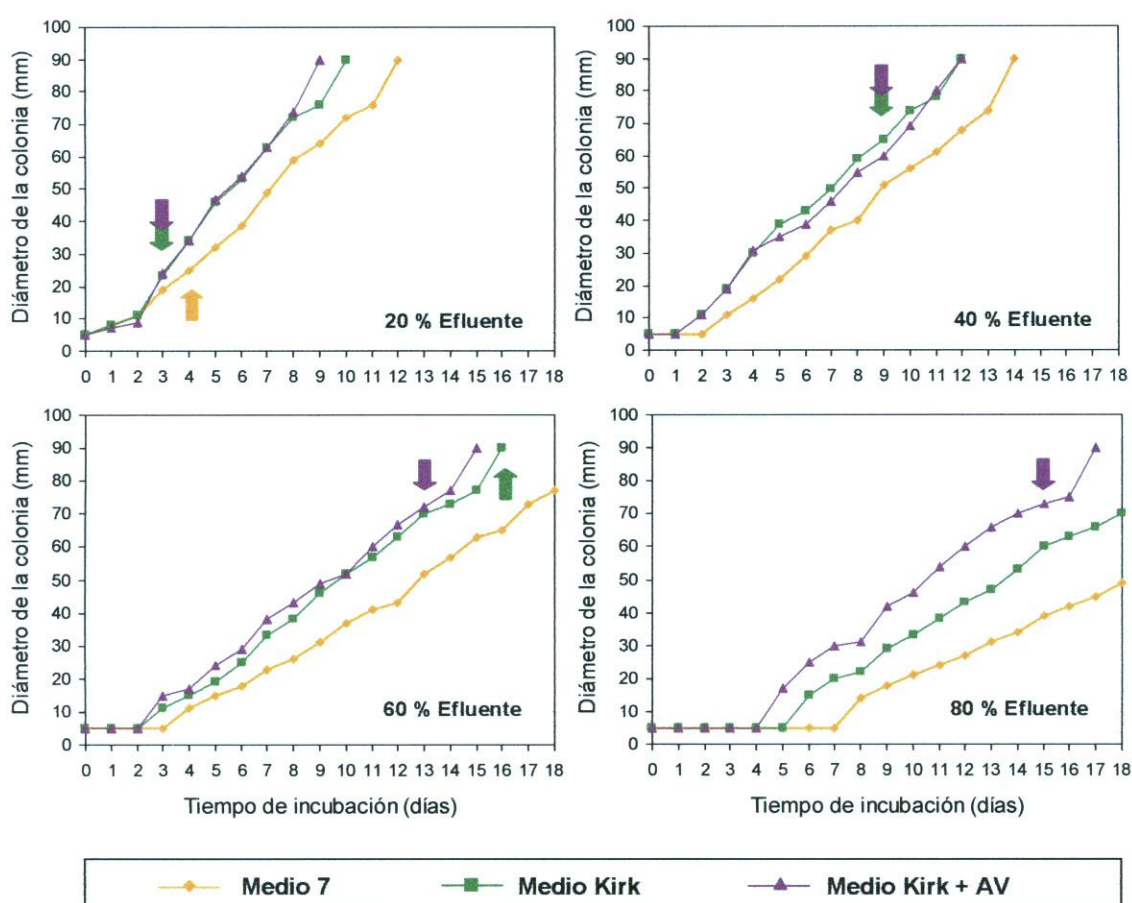


Figura 8: Capacidad de crecimiento y decoloración de *Coriopsis gallica* en diferentes medios sólidos suplementados con distintas concentraciones de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.

Comparando el crecimiento de *C. gallica* a distintas concentraciones de efluente se pudo observar como en el medio 7 el desarrollo del hongo fue siempre más lento que en medios Kirk con y sin alcohol veratrílico, y que a mayor concentración del efluente el crecimiento del hongo se fue haciendo más lento en todos los medios. También, se observó que a bajas concentraciones del efluente, la adición de alcohol veratrílico apenas influyó en el crecimiento del hongo, sin embargo

cuando se suplementó el medio de cultivo con 80% de efluente sí que se observaron diferencias apreciables en el crecimiento, siendo el hongo capaz de desarrollarse mejor en el medio Kirk con alcohol veratrílico que sin él, además, de ser en el único medio donde se vio decoloración a esta concentración de efluente (Fig. 8).

En todos los medios suplementados con un 20% de efluente se produjo decoloración, comenzando el día 3 de incubación en medio Kirk (con y sin alcohol veratrílico) y el día 5 en medio 7. Sin embargo, esta decoloración fue más acusada en medio Kirk que en medio 7, además, en este medio, la decoloración comenzó desde la periferia de la placa hacia el centro de la misma, mientras que en los medios Kirk se produjo desde la zona central hacia el exterior, como ya se había observado en los estudios anteriores. En el medio Kirk con alcohol veratrílico fue donde se produjo una decoloración más intensa, pero a su vez, fue también donde se originaron mayor cantidad de pigmentos oscureciendo el medio de cultivo (Fig. 9). Estos pigmentos fueron producidos siguiendo el crecimiento radial del micelio e hizo que se formara un sobrecrecimiento del hongo sobre la zona donde se desarrollaron los cromóforos. En medio Kirk sin alcohol veratrílico y en medio 7 también hubo producción de pigmentos pero de forma más puntual y menos acusada.

En los medios adicionados con 40% de efluente se produjo decoloración en el medio Kirk con y sin alcohol veratrílico comenzando en el día 9 del crecimiento del hongo y siendo mayor cuando el medio Kirk no contenía este inductor. En el medio 7 no se observó decoloración dentro de los primeros 30 días de incubación. Cuando la proporción de efluente fue del 60% o del 80%, las placas en las que mayor decoloración se produjo fueron en las que contenían medio Kirk con alcohol veratrílico. Pero en ambas concentraciones de efluente esta decoloración fue muy débil y tardía, comenzando entre los días 13 y 14 de incubación. En el medio Kirk sin inductor y a una concentración de efluente de 60% o del 80% también hubo decoloración, pero ésta se retrasó hasta el día 16 ó 20 del crecimiento, respectivamente (Fig. 9).

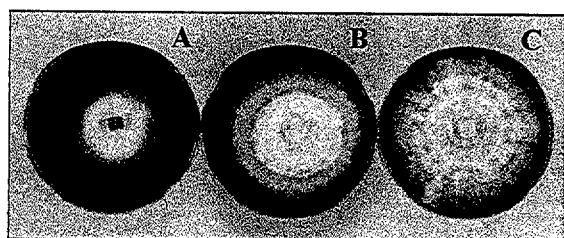


Figura 10: Diferencia en el crecimiento de *Coriopsis gallica* en distintos medios suplementados con 80 % de efluente. Tiempo de incubación: 20 días. A: Medio 7; B: Medio Kirk; C: Medio Kirk con alcohol veratrílico.

En resumen, podemos decir que en medio 7, *Coriopsis gallica* fue capaz de crecer en todas las concentraciones de efluente, si bien su crecimiento se hizo más lento a medida que se fue aumentando el porcentaje de efluente adicionado. Sin embargo en este medio, *C. gallica* sólo fue capaz de decolorarlo a una concentración de 20% de efluente, que fue la más baja ensayada.

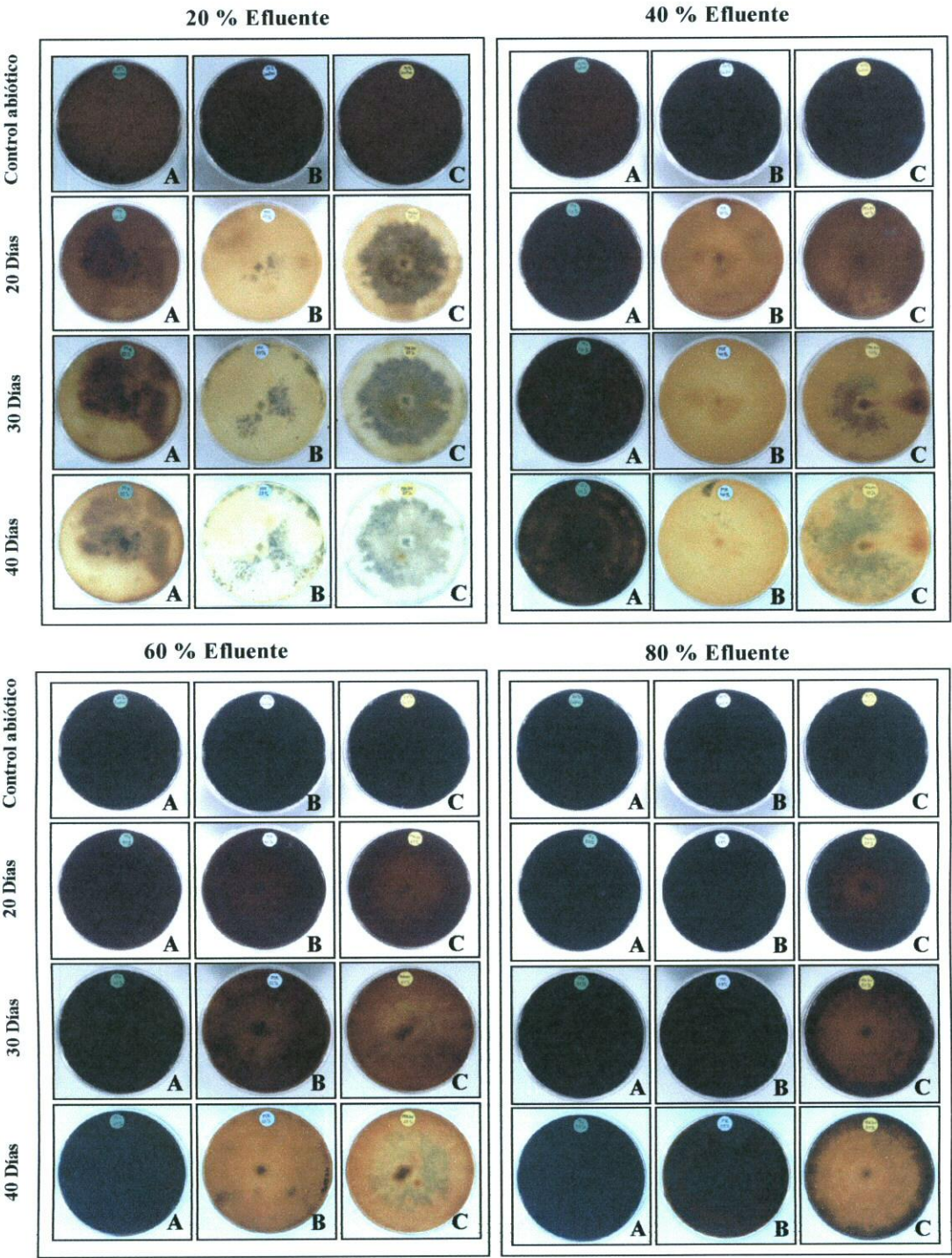


Figura 9: Decoloración del efluente producida por *Coriopsis gallica* en diferentes medios sólidos suplementados con distintas concentraciones de efluente. **A:** Medio 7; **B:** Medio Kirk; **C:** Medio Kirk con alcohol veratrílico.

En el medio Kirk con y sin alcohol veratrílico, este hongo creció y decoloró el efluente a bajas concentraciones (20 y 40%). Sólo se vieron diferencias apreciables en el crecimiento (Fig. 10) y en la decoloración, a la concentración más elevada de efluente ensayada (80%) en la cual se observó que el desarrollo micelial del hongo y la degradación del efluente eran mayores en presencia del alcohol veratrílico.

3.2.1.4. Actividad ligninolítica en medios sólidos.

La hipótesis de partida fue que la degradación producida por el hongo, de este efluente de la industria cervecera, implicaría la participación de su sistema ligninolítico, sin descartar la contribución de otras enzimas al proceso. Por esta razón se decidió realizar un ensayo que contemplara en primer lugar el estudio de las capacidades ligninolíticas de *C. gallica*, mediante el uso de colorantes poliméricos de tipo antrona Poly R-478 y Azul de Ramazol. Se ha descrito que la degradación y decoloración de este tipo de colorantes se relaciona con la capacidad de los hongos de podredumbre blanca de producir enzimas ligninolíticas. El Azul de Ramazol ha sido descrito como un sustrato de fenoloxidasas principalmente (Bourbonnais y Paice, 1990; Zapico, 1999) y peroxidasas (Chahal y col., 1995), mientras que la decoloración del colorante Poly R-478 ha sido relacionada fundamentalmente con la presencia de peroxidasas extracelulares (Gold y col., 1988).

Como ya se mencionó en el apartado 3.1.1. los taninos constituyen una parte importante de la composición del efluente. Por esta razón, en segundo lugar se realizó un estudio para comprobar si *C. gallica* es capaz de producir de manera extracelular la enzima tanasa, de manera que esta enzima fuera una de las responsables de la degradación del efluente.

3.2.1.4.1. Decoloración de colorantes poliméricos.

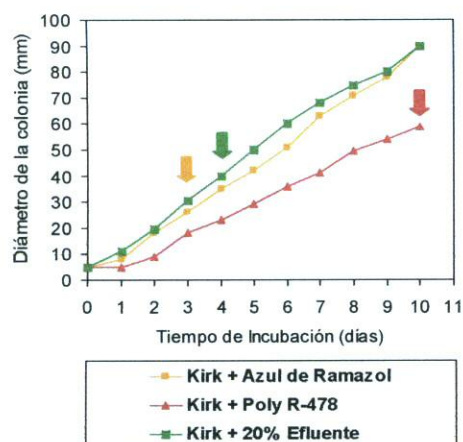


Figura 11: Capacidad de crecimiento de *Coriopsis gallica* en medio Kirk sólido suplementado con colorantes poliméricos y 20 % de efluente. Las flechas indican el comienzo de la decoloración.

Para la realización de este ensayo se utilizó el medio Kirk que fue suplementado con los colorantes poliméricos Azul de Ramazol y Poly R-478, tal y como se describe en el apartado 2.4.1.1.1 de Materiales y Métodos. Con el fin de comparar los parámetros de crecimiento y decoloración de *C. gallica* en este ensayo se incluyeron como control placas de medio Kirk más 20% de efluente.

El crecimiento fue muy similar tanto en el medio con Azul de Ramazol, como en el medio suplementado con 20% de efluente. Sin embargo, el

desarrollo del micelio del hongo fue más lento en el medio que contenía el colorante Poly R-478 (Fig. 11). La decoloración también fue muy análoga en las placas con efluente y Azul de Ramazol. En ambos casos, esta decoloración comenzó en los primeros días de crecimiento del hongo (días 3 y 4 de incubación, respectivamente), si bien fue más intensa en las placas de Azul de Ramazol. En el día 10 de incubación las placas del Azul de Ramazol estaban prácticamente decoloradas, las de 20% de efluente se encontraban en un 50% de decoloración de la placa y las de Poly R-478 comenzaban a decolorarse en este día (Fig. 12). Al día 14 de incubación la decoloración era prácticamente del 100% en todos los casos.

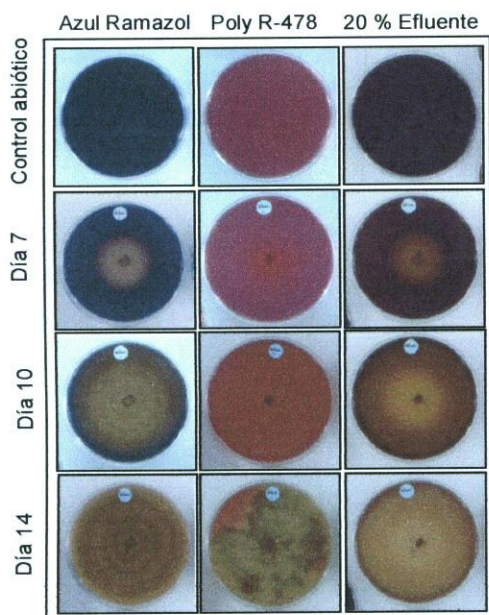


Figura 12: Decoloración de los colorantes poliméricos Azul de Ramazol y Poly R-478, y del efluente por *Coriopsis gallica* en cultivos en placa con medio Kirk.

Hasta la fecha, en *C. gallica* no se han detectado actividades de lignina ni manganoso peroxidasa, pero si se ha detectado, clonado y secuenciado un gen de lacasa (*cglcc1*) (Calvo, 1995; Calvo y col., 1998; Zapico, 1999; Carbajo, 2001). Zapico, 1999, demostró como el Azul de Ramazol producía un efecto inductor sobre la actividad lacasa semejante al efecto inductor producido por efluentes de la industria papeleras, y como la enzima lacasa era la responsable de la decoloración de este sustrato, al aumentar los niveles de transcritos del gen *cglcc1* de *C. gallica* coincidiendo con la decoloración del Azul de Ramazol. Estos datos podrían explicar la decoloración temprana del Azul de Ramazol y del efluente, mientras que en medios con Poly R-478 tanto el crecimiento como la decoloración se dieron tardíamente y con menos intensidad.

3.2.1.4.2. Estudio de la producción de tanasa extracelular por *Coriopsis gallica*.

El objetivo de este estudio fue el de comprobar si *C. gallica* es capaz de producir tanasas extracelulares. La enzima tanasa, (EC 3.1.1.20), cataliza la esterificación de ácido tánico a ácido gálico y glucosa y en la naturaleza juega un papel muy importante en la recirculación de la biomasa de plantas (White, 1957). Se ha descrito que muchos microorganismos, especialmente hongos, producen esta enzima en ambas formas, ligada a membrana y extracelular. Las tanasas se han aplicado en el tratamiento de efluentes de curtido así como en la producción industrial de ácido gálico (Iibuchi y col., 1968).

El efluente utilizado en este estudio, como se ha mencionado en el apartado 3.1. de Resultados, esta formado por compuestos fenólicos, fundamentalmente taninos. Con este ensayo se pretendía ver si la degradación de este efluente pudiera ser debida a la producción de este tipo de enzimas por el hongo. Bradoo y colaboradores, (1996), estudiaron la producción de tanasa extracelular en cincuenta hongos pertenecientes a diversos grupos. Entre ellos, *Asperguillus niger* fue una de las mejores cepas productoras de tanasa. Por ello, esta cepa fue utilizada como control positivo de la producción de esta enzima. Tras 7 días de incubación se vio que, mientras *A. niger* había crecido y presentaba un halo de degradación del ácido tánico, *C. gallica* no era capaz de crecer en ácido tánico exclusivamente. Por lo que se modificó el medio de cultivo, utilizando medio 7, sin fuente de carbono, y se le adicionó ácido tánico al 1%, observándose entonces crecimiento del hongo pero no decoloración. Esto nos lleva a pensar que este hongo probablemente no produzca este tipo de enzima, con lo cual la degradación del efluente puede ser debida a su actividad ligninolítica.

3.2.1.5. Decoloración del efluente en medio Kirk con distintas fuentes de carbono.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, con *Coriolopsis gallica*, han mostrado como la decoloración de diferentes efluentes industriales está influida por el tipo de fuente de carbono utilizada en los medios de cultivo (Calvo, 1995). El tipo de fuente de carbono y su concentración, en el medio de cultivo, también mostraron influencia sobre los niveles de actividad lacasa detectados en los cultivos líquidos. A su vez, se realizaron estudios del efecto producido por variaciones en la fuente de nitrógeno, sobre los niveles de actividad lacasa, no encontrándose influencias significativas (Zapico, 1999).

Con estos antecedentes, se realizó un estudio de la decoloración del efluente en medio Kirk con diferentes fuentes de carbono. El ensayo se realizó con una suplementación del 20% de efluente, a la vez que se realizó un ensayo en paralelo con el colorante Azul de Ramazol, para comparar el crecimiento y la capacidad ligninolítica de *C. gallica* en estos medios. En ambos casos (medios con efluente o Azul de Ramazol) el crecimiento del hongo fue muy semejante en aquellos medios que contenían glucosa, fructosa y manosa. Sin embargo cuando el medio de cultivo tenía sorbosa, el crecimiento se vio bastante disminuido, quizás porque la sorbosa puede ser una fuente de carbono poco metabolizable por el hongo. El desarrollo de *C. gallica* fue mejor en los medios con efluente que en aquellos que contenían Azul de Ramazol (Fig. 13).

Sin embargo, en cuanto a decoloración se refiere, fue muy similar en los medios con efluente como en aquellos que contenían Azul de Ramazol (Fig. 14). En ambos casos, se observaron diferencias en la decoloración en relación al tipo de fuente de carbono utilizada.

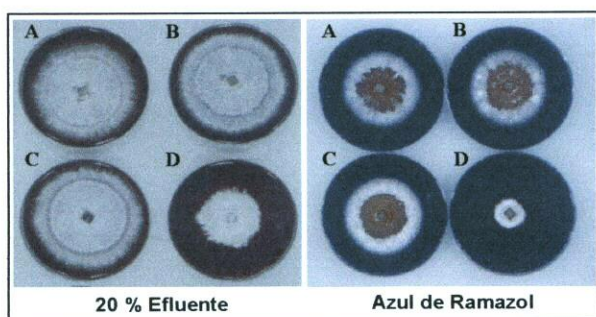


Figura 13: Diferencias en el crecimiento de *Coriopsis gallica* en medio Kirk suplementado con Azul de Ramazol y efluente. Tiempo de incubación: 7 días. A: Medio Kirk con glucosa; B: Medio Kirk con fructosa; C: Medio Kirk con manosa; D: Medio Kirk con sorbosa.

En el medio Kirk que contenía sorbosa como fuente de carbono, cabe destacar que aún siendo el desarrollo del hongo bastante más lento, en comparación con los otros medios (Fig. 13), la decoloración producida fue más intensa. En el día 10 de incubación, el micelio, en los medios con sorbosa y Azul de Ramazol, había alcanzado aproximadamente el 30% de la placa de cultivo, y ya se observaba un halo de decoloración del 50% de la placa. En el mismo día de incubación, en medios con efluente y sorbosa, el hongo había cubierto de micelio el 50% de la placa y también se observó un halo de decoloración del 50%, aproximadamente. Esto puede deberse probablemente a que el crecimiento del hongo fue mucho menor por ser la sorbosa una fuente de carbono poco metabolizable para el hongo, favoreciéndose así la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares capaces de degradar el efluente y el colorante. En el caso del Azul de Ramazol se observó como el crecimiento empezó a aumentar rápidamente cuando comenzó la decoloración del colorante.

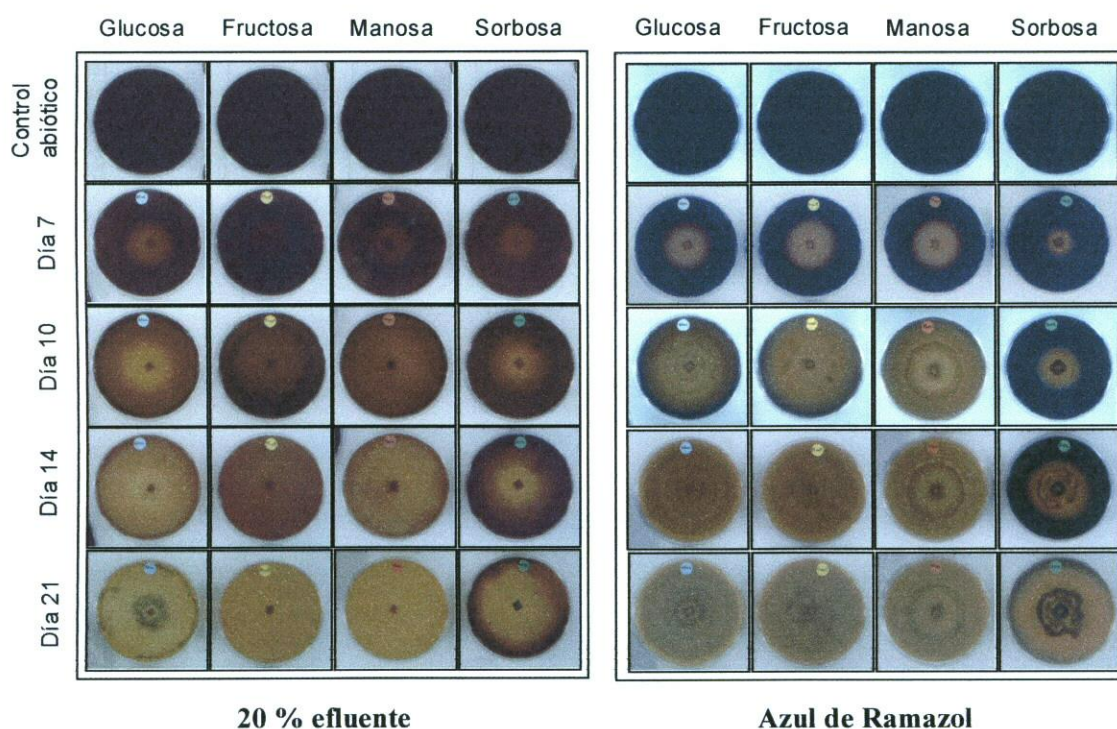


Figura 14: Decoloración del efluente y Azul de Ramazol producida por el crecimiento de *Coriopsis gallica* en medio Kirk con distintas fuentes de carbono.

3.2.2. Estudios de decoloración en medios líquidos.

Las pruebas cualitativas realizadas para el estudio de la degradación y decoloración del efluente por *Coriopsis gallica* en medios sólidos, son una herramienta útil que nos sirve para valorar la capacidad degradativa de este microorganismo, pero en ningún caso el resultado de estas pruebas puede considerarse como un criterio concluyente, y debe complementarse con análisis adicionales que nos permitan obtener una información más completa de un proceso que esta influido por múltiples factores y que es extraordinariamente variable, según el organismo de que se trate. Por ello se iniciaron una serie de ensayos con el objetivo de estudiar las condiciones apropiadas para la degradación de este efluente por biotratamiento con *C. gallica*, en medios líquidos.

3.2.2.1. Posible efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos del efluente sobre el crecimiento de *C. gallica*.

En los ensayos cualitativos realizados en placas se había observado que *C. gallica*, en condiciones control, sin efluente, se desarrollaba de manera similar tanto en medio 7 como en medio Kirk. Sin embargo, cuando a estos medios se les adicionaba distintas concentraciones de efluente, su comportamiento era diferente, observándose una disminución en el crecimiento en medio 7 con efluente. Se realizó entonces un estudio de la capacidad de crecimiento de *C. gallica* en medio 7 líquido, con distintas concentraciones de efluente que fueron de 20% (V_1), 40% (V_2) y 60% (V_3). Se extrajo el micelio, en diferentes días del biotratamiento para cuantificar su peso seco y con ello la biomasa del hongo. Los valores de peso seco del micelio a lo largo del tiempo de incubación se muestran en la tabla 5. Un porcentaje de efluente industrial de 20% (V_1) o de 40% (V_2) no afectó al crecimiento normal de *Coriopsis gallica*. Por el contrario, los valores de peso seco del micelio, en el día 6 de cultivo, fueron notablemente más bajos en las muestras que contenían 60% de efluente (V_3) y se observó un crecimiento más lento del hongo (Tabla 6).

Tabla 6: Crecimiento de *Coriopsis gallica* en medio 7 líquido en presencia de diferentes concentraciones de efluente, determinado gravimétricamente como Peso Seco de micelio, expresado en mg.

	Tiempo de incubación (días)		
	0	6	12
V_1 (20% Efluente)	0	417,3	660,6
V_2 (40% Efluente)	0	364,8	723,4
V_3 (60% Efluente)	0	158,3	844,7

La alta proporción de taninos o sustancias polifenólicas presentes en V_3 podría explicar este posible efecto inhibitorio del efluente sobre el crecimiento de *C. gallica*. Los efectos tóxicos de los

compuestos tánicos sobre el crecimiento de muchos microorganismos son bien conocidos (Scalbert, 1991; Zhao y Kwan, 1999). Es de destacar que como si ocurriera un posible fenómeno de adaptación el medio, una vez que este retraso del crecimiento se superó, el hongo entró en una fase de crecimiento exponencial y los valores de peso seco del micelio en el día 12 de incubación, fueron incluso superiores a los de las muestras que contenían más baja proporción de efluente (Tabla 6).

3.2.2.2. Decoloración y disminución de la DQO en medio 7 con distintas concentraciones de efluente.

Una vez analizadas las diferencias en el crecimiento de *C. gallica* en este medio, con diferentes concentraciones de efluente, se estudio la influencia de este crecimiento sobre la decoloración del efluente. Para ello, se tomaron muestras del cultivo en distintos días para evaluar decoloración, DQO, y cuantificar el valor del peso seco de la fracción polifenólica de las muestras biotratadas con el hongo, obtenida mediante su precipitado con ácido.

El porcentaje de decoloración del efluente en los diferentes días de incubación con *C. gallica* se muestran en la figura 15 (A). Aunque en todos los casos, los valores de decoloración al final del período de incubación fueron del 50% aproximadamente, estos valores fueron muy diferentes en el día 6 de experimento. En las muestras que contenían un 20% de efluente (V_1) se alcanzó una reducción del color de 40% aproximadamente ya en el día 6 de tratamiento y fue ligeramente superior en el día 12 de la cinética. Por otro lado, una mínima disminución de color fue observada en los primeros seis días de incubación en las muestras que contenían 40% de efluente (V_2), consiguiéndose un 51% de reducción de color final en los últimos seis días de tratamiento.

Los valores más bajos de decoloración (45,7%) fueron obtenidos en las muestras que contenían una mayor proporción de efluente (60%). Además, en este caso, se produjo un aumento de las unidades de color, durante los seis primeros días de tratamiento con el hongo, dando valores “negativos” de decoloración. Este aumento del color puede ser debido a la producción de pigmentos por el hongo, como ha sido reportado por Bergbauer y Eggert (1993) en algunos hongos de podredumbre blanca como *Trametes versicolor*, si bien un incremento de color debido a la actividad lacasa no debe ser descartado bajo estas condiciones experimentales. Bollag y colaboradores (1988) observaron la adaptación del hongo a los compuestos fenólicos tóxicos por medio de la actividad de una lacasa que era capaz de mediar la detoxificación de estos compuestos, catabolizando su polimerización formando fenoles que resultaban menos tóxicos para las células. El incremento de color que fue observado al día 6 de tratamiento en la muestra V_3 , que contenía la más alta proporción de taninos, puede ser el resultado de esta reacción de polimerización.

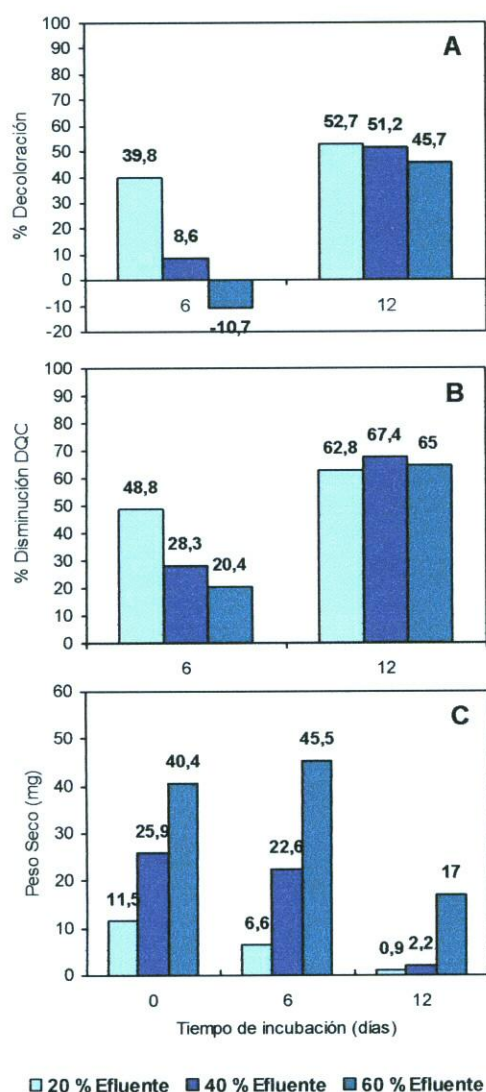


Figura 15: Decoloración (A) Disminución de DQO (B) y Peso Seco de la fracción precipitada con ácido (C) de las muestras de efluente tomadas en los diferentes días de tratamiento con el hongo *Coriopsis gallica*.

reducción (28,3%) se logró, también, en los primeros seis días de tratamiento. Se observó una tendencia similar a los resultados de decoloración en las muestras V₃, produciéndose los resultados más altos de disminución de DQO en los últimos seis días de biotratamiento, aumentando del 20% al 65%.

La disminución del peso seco de la fracción precipitada con ácido de las muestras del cultivo con ácido, mostró una tendencia similar a las de las unidades de color y a los resultados de reducción de DQO (Fig. 15 C). El ligero incremento en los valores de peso seco de la fracción precipitada en la primera semana del experimento en V₃, comparado con los valores iniciales correspondientes a esta muestra, apoya la hipótesis de una posible polimerización de los compuestos fenólicos, que se mencionó con anterioridad. Al igual que los resultados de

Los valores absolutos más altos de decoloración fueron conseguidos por *Coriopsis gallica* en la muestra V₃, durante los últimos seis días de cultivo variando desde valores “negativos” de decoloración (-10,7%) en el día 6 de cultivo, hasta 45,7% de reducción de color en el día 12. Ha de tenerse en cuenta que no se observó ninguna adhesión de color oscuro al micelio del hongo, por lo cual los resultados de la decoloración pueden ser atribuidos a un mecanismo de degradación fúngica.

Los resultados en la disminución de la demanda química de oxígeno mostraron una tendencia similar a los de la decoloración. De la misma manera, la reducción final de la DQO observada en todas las muestras fue de alrededor del 65%, mientras que los valores del día 6 de experimento fueron muy diferentes en cada caso. En la muestra V₁ un 48,8% de disminución de la DQO tuvo lugar en los primeros seis días de incubación con el hongo consiguiendo solamente una pequeña reducción adicional en el resto del tiempo de incubación (Fig. 15 B).

La mayor parte de la disminución de la DQO en V₂, se observó en la segunda semana de la cinética con el hongo; aunque, en este caso, una importante

decoloración y reducción de la DQO, la máxima reducción de peso seco de la fracción precipitada se observó desde el día 6 al día 12 de tratamiento con el hongo, en la muestra V₃.

Teniendo en cuenta, el ya mencionado retraso en el crecimiento del hongo en las muestras V₃, es posible explicar los resultados de decoloración y reducción de DQO. La decoloración y la reducción de DQO apenas pudo tener lugar si no existió un crecimiento óptimo del hongo, como es el caso de la muestra V₃ durante los primeros seis días de incubación. Sin embargo, una vez que el hongo se adaptó al estrés producido por estas sustancias, comenzó su crecimiento y los procesos de decoloración y de reducción de la DQO no solamente fueron posibles, sino que también se consiguió una alta eficiencia, como indicaron los resultados observados desde el día 6 al día 12 de tratamiento en la muestra V₃ (Fig. 15A y 15B).

En esta cinética se intentó medir tanto actividad lacasa, como lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa sin ningún éxito, debido a la interferencia producida por el color tan oscuro de las muestras del cultivo.

3.2.2.3. Optimización de las condiciones de decoloración en medio Kirk.

3.2.2.3.1. Decoloración del efluente en medio Kirk con distintas concentraciones de glucosa.

En los ensayos cualitativos realizados en placa se vio como la degradación del efluente por *C. gallica* estaba influida por el tipo de fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo, así como por la adición del alcohol veratrílico, a altas concentraciones de efluente. Estudios realizados en nuestro laboratorio, con *Corioloopsis gallica*, han mostrado como el tipo de fuente de carbono y su concentración, en el medio de cultivo, son factores que influyen sobre actividad lacasa (Zapico, 1999).

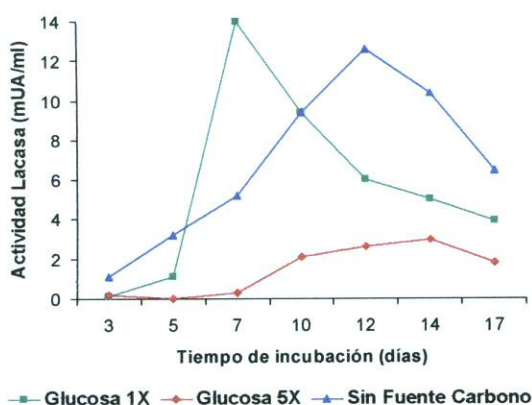


Figura 16: Actividad lacasa detectada en los cultivos de *C. gallica* en medio Kirk. Glucosa 1X: Kirk con glucosa (10g/l); Glucosa 5X: Kirk con glucosa (50g/l); SFC: Kirk sin fuente de carbono.

A partir de estos antecedentes se decidió probar otras variaciones en la concentración de la fuente de carbono del medio Kirk con vistas a optimizar las condiciones para una mejor decoloración del efluente. Para ello se utilizó el medio Kirk como control y medio Kirk con concentración de glucosa 5 veces superior a la habitual en el medio Kirk (5X). A su vez se empleó medio Kirk sin fuente de carbono, para comprobar si el hongo es capaz de utilizar el efluente para obtener nutrientes para su crecimiento. En este estudio se utilizó el efluente a una concentración del 40%.

En la figura 16 se muestran los valores de actividad lacasa detectados en distintos días de incubación del hongo. Estos niveles de actividad fueron muy distintos en las diferentes variaciones de la concentración de la fuente de carbono. Así, en medio Kirk control, con glucosa 10 g/l, el máximo de actividad se obtuvo en el día 7 de crecimiento, siendo además el valor más alto de actividad detectado.

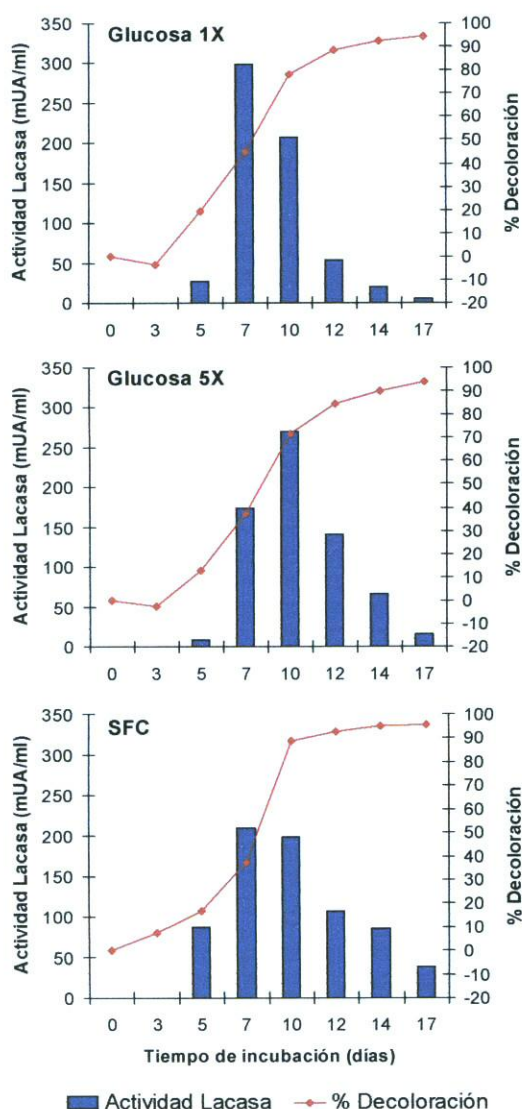


Figura 17: Actividad lacasa y porcentaje de decoloración de *C. gallica* en medio Kirk con 40% de efluente. Glucosa 1X: Kirk control con glucosa 10 g/l; Glucosa 5X: Kirk glucosa 50 g/l; SFC: Kirk sin fuente de carbono.

En los otros dos medios, este máximo de actividad se detectó en los días 12 para el medio sin fuente de carbono y 14 para el medio con glucosa 5X. Los valores de actividad (en medio Kirk 5X) fueron aproximadamente 5 veces más bajos que los observados en el medio Kirk control. En estos valores hay que tener en cuenta que el crecimiento del hongo fue muy similar tanto en medio Kirk control, como en medio Kirk con glucosa 5X, sin embargo en el medio sin fuente de carbono la biomasa del hongo fue mucho menor (datos no mostrados), probablemente debido a la falta de una fuente de carbono.

Estos resultados pudieran ser explicados por la producción de la enzima ligninolítica lacasa cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento del hongo. Así en el medio sin fuente de carbono, la actividad lacasa detectada es alta, debido al estrés producido por la falta de carbono en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando el hongo creció con una alta concentración de glucosa (5X), un medio rico, las actividades detectadas fueron muy bajas.

En cuanto a la actividad lacasa en estos medios pero suplementados con 40% de efluente, el patrón fue muy diferente con respecto a los controles sin efluente. La actividad lacasa, en general, se vio enormemente aumentada, con respecto a los controles (Fig. 16), corroborando el efecto inductor que produce el efluente sobre esta actividad enzimática (Fig. 17). En el caso del medio

Kirk con glucosa 1X el aumento de la actividad fue de aproximadamente 20 veces con respecto al control sin efluente y en el medio sin fuente de carbono fue de aproximadamente 16 veces.

Sin embargo, en el medio con glucosa 5X los valores de actividad lacasa fueron aproximadamente 100 veces superiores que los detectados en el control sin efluente. Además el máximo de actividad lacasa en esta condición tuvo lugar más tarde (día 10 de incubación), mientras que en los otros dos medios, las máximas actividades se dieron en el día 7 de la cinética. Posiblemente estén afectando diversos factores en este incremento de la actividad lacasa, uno de ellos podría ser el ya mencionado efecto inductor que produce el efluente y otro la elevada biomasa desarrollada en estas condiciones de altas concentraciones de glucosa. En todos los casos se observó como el tamaño de los agregados de micelio eran mayores cuando los medios tenían efluente, además los agregados adoptan formas morfológicas estrelladas, que no fueron observadas en los medios sin efluente. Un ejemplo puede verse en la figura 18.

En cuanto a decoloración se refiere, en todos los casos siguió más o menos el mismo patrón, con algunos matices. En las tres variaciones del medio Kirk se llegó, en el día 17 de la cinética a un 95% aproximadamente de decoloración del efluente, si bien esta fue un poco más alta (96%) y se produjo algo más temprana en el medio que no contenía fuente de carbono. Así, en el día 10 de biotratamiento con el hongo, en glucosa 1X se había producido una decoloración del efluente del 78%, en medio con 5X de glucosa un 71% y en medio sin fuente de carbono ya se había alcanzado un 89% de decoloración (Fig. 19). Esta decoloración algo más adelantada, puede deberse a que el hongo se encuentra en condiciones más desfavorables para el crecimiento por la falta de carbono, por ello puede que dispare su sistema ligninolítico para intentar degradar el efluente y obtener de ahí los nutrientes necesarios para su desarrollo. Además de que en los otros dos medios se dieron valores “negativos” de decoloración en los primeros días del tratamiento.

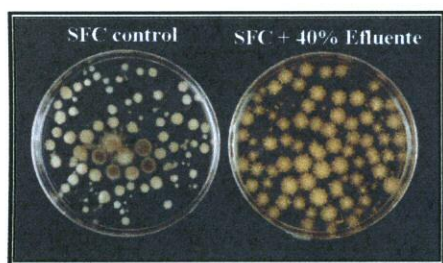


Figura 18: Diferencias en el tamaño y morfología de los agregados de micelio de *C. gallica* crecido en medio Kirk sin fuente de carbono control y con 40% de efluente.

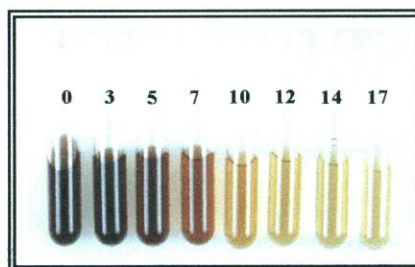


Figura 19: Decoloración producida por *C. gallica* en medio Kirk con 40% de efluente y sin fuente de carbono. Los números indican los días de tratamiento con el hongo.

En los zimogramas de lacasas realizados con alícuotas de 20 µl de medio de cultivo de muestras procedentes de distintos días de tratamiento con el hongo (Fig. 20) se pudo observar como en el medio Kirk sin efluente aparece una banda, muy tenue (en los días 7 y 10 de cultivo), que coincide con los bajos niveles extracelulares de actividad lacasa y que se corresponde a la descrita

por Calvo (1995) y Zapico (1999) para este hongo y bajo estas mismas condiciones. Esta banda coincidió con los máximos valores de actividad lacasa detectada espectrofotométricamente en los cultivos de 7 y 10 días de incubación.

Sin embargo, en los medios con efluente el patrón de bandas de lacasa fue muy diferente. En primer lugar, en todos los casos, se observaron dos bandas más intensas coincidiendo con los días de máxima actividad lacasa y decoloración, también descritas por Calvo (1995) bajo condiciones de decoloración de efluentes procedentes de la industria papelera. Estas dos bandas tuvieron pesos moleculares aparentes ligeramente superior al encontrado en el medio control, probablemente debido a la existencia de diferentes estados de glicosilación de la proteína, que afectan levemente su migración electroforética. Las lacasas cuentan, en sus secuencias aminoacídicas, con varios sitios potenciales de glicosilación, y dicha glicosilación ha sido descrita en las lacasas secretadas por varios hongos (Perry y col., 1993; Giardina y col., 1996; Calvo y col., 1998).

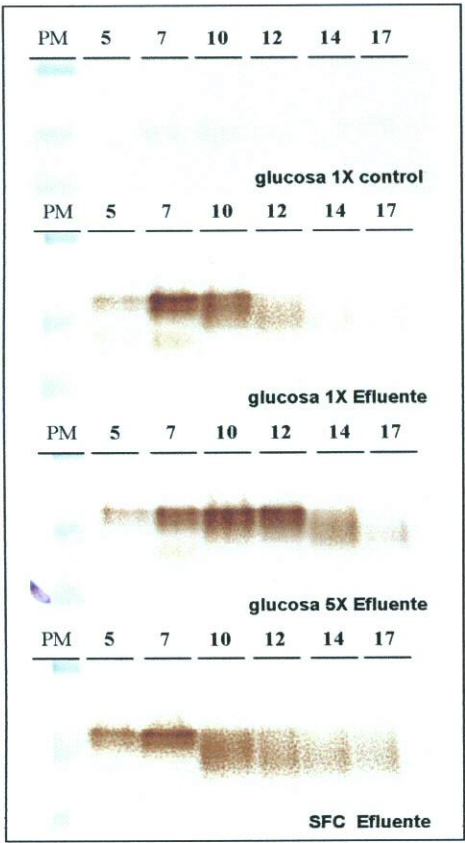


Figura 20: Zimogramas de actividad lacasa, en condiciones no desnaturalizantes, producida por *C. gallica* en los distintos días de la cinética, revelados con 2,6-dimetoxifenol. PM: peso molecular. SFC: sin fuente de carbono.

Por otro lado, el patrón de bandas de lacasas también fue distinto en los diferentes días de incubación. Además de estas dos bandas intensas, en los medios de glucosa 1X y 5X, se observaron otra serie de bandas más tenues que fueron desapareciendo hacia los últimos días de tratamiento. En estos mismos medios se observó en los primeros días de incubación (día 5 y 7 para glucosa 1X y día 7 para glucosa 5X) otra banda por debajo de las más intensas que no se detectaron en otros días de la cinética. Esto coincide con el hecho de que en estos medios se produjo, en los primeros días de biotratamiento del efluente, un aumento del color del mismo, probablemente por polimerización. Puede que en estos días se produzcan isoenzimas diferentes a las producidas en estados de decoloración, que sean las responsables de esta polimerización.

3.2.2.3.2. Decoloración en medio Kirk con sorbosa como fuente de carbono.

En los estudios cualitativos de la degradación del efluente por *Corioloopsis gallica* en medios sólidos y en este último ensayo de decoloración en medios líquidos, se observó que este proceso alcanza valores más elevados cuando el hongo se desarrolla en condiciones desfavorables o estresantes para su crecimiento, caso del medio Kirk frente a medio 7, medio Kirk con sorbosa frente a otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables o este último caso de medio Kirk sin fuente de carbono. En el último ensayo, cuando el medio no contenía fuente de carbono, la decoloración fue algo mayor comparándola con los otros medios, sin embargo hubo poco crecimiento del hongo. Por ello se decidió realizar un estudio de decoloración y actividad lacasa en medio Kirk pero utilizando sorbosa como fuente de carbono, ya que si bien la sorbosa es poco metabolizable por el hongo, le permite desarrollarse mejor que sin fuente de carbono. El medio se suplementó con 40% de efluente.

En la figura 21 (A) pueden observarse los datos de actividad lacasa detectados en las diferentes muestras tomadas en distintos días de biotratamiento con el hongo. Esta actividad lacasa fue medida con el sustrato 2,6-dimetoxifenol. La modificación en el sustrato utilizado para la medición de la actividad lacasa fue debida a que estudios realizados en nuestro laboratorio por Carbajo (2001) y Terrón y colaboradores (2004) revelaron el efecto de la interferencia de compuestos como el ácido tánico en la cuantificación espectrofotométrica de la actividad lacasa cuando se usa ABTS como sustrato. Estos compuestos son capaces de reducir químicamente el ABTS, en ausencia de la enzima, lo que interfiere en el ensayo de cuantificación de la actividad lacasa, obteniéndose valores inferiores a los reales. Otros autores, también han mostrado resultados similares con sustancias como el ácido tioglicólico y el ditiotreitól, que han sido descritas inicialmente como sustancias inhibidoras de lacasas, sin embargo no son en realidad tales inhibidores sino que afectan al método de medición empleado reduciendo químicamente el ABTS y subestimando por tanto los valores de actividad lacasa (Johannes y Majchercyk, 2000b).

Como puede observarse en la figura 21 (A), los valores de actividad lacasa fueron superiores a los detectados en otras condiciones de decoloración. Esto quizás se deba al método de medición de la actividad lacasa con ABTS en otros ensayos, que han proporcionado datos erróneos cuantitativamente, subestimando los resultados. En el medio Kirk con sorbosa control, sin efluente (Fig. 21A), aparecieron valores de actividad lacasa superiores a los encontrados en medio Kirk con glucosa. Su máximo de actividad se alcanzó en el día 11 de incubación con el hongo y fue de, aproximadamente, 3 veces superior a los valores encontrados tanto en medio Kirk con glucosa como en medio Kirk sin fuente de carbono, en el día de máxima actividad (Fig. 16).

Cuando los cultivos se realizaron con 40% de efluente, el máximo de actividad se observó en el día 5 de tratamiento con *C. gallica*. Se detectó un incremento, bastante importante, de la actividad lacasa del día 3 al día 5 de la cinética, para posteriormente ir reduciendo esta actividad progresivamente hasta el último día del ensayo (Fig. 21A). Este máximo de actividad lacasa supuso un incremento de unas 50 veces de los valores detectados en los medios controles, sin efluente.

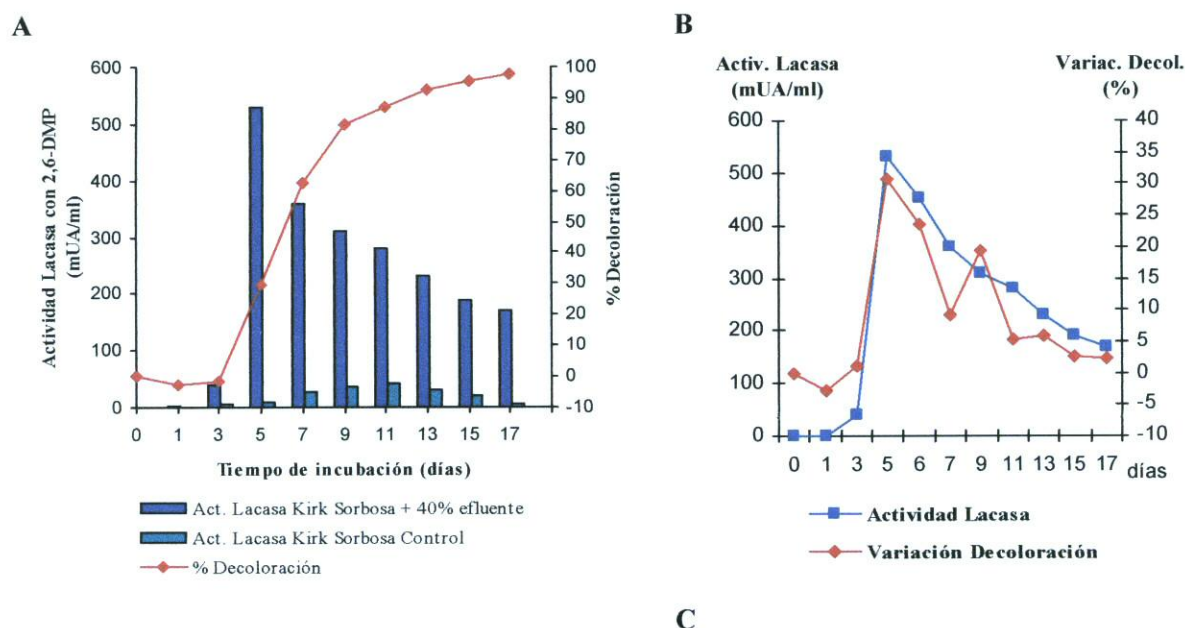


Figura 21: Actividad lacasa medida con 2,6-dimetoxifenol y porcentaje de decoloración del efluente en los cultivos de *C. gallica* en medio Kirk con sorbosa control y en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente (A). Niveles de actividad lacasa detectados en diferentes días de cultivo en medio Kirk con sorbosa suplementado con efluente y variación de la decoloración del efluente en esos mismos días (B). Análisis de regresión de los valores de actividad lacasa y la variación de la decoloración del efluente (C).

La decoloración del efluente alcanzó valores próximos al 98% en el último día de biotratamiento con el hongo. El color del efluente cambió del color marrón oscuro a un tono amarillento en el último día de tratamiento (Fig. 22). En los primeros días hubo un oscurecimiento del medio de cultivo, dándose valores “negativos” de decoloración. A partir del día 3 de incubación ésta se disparó alcanzando en el día 7 algo más de 60% de decoloración. Esto coincidió con los días de máxima actividad lacasa detectada en los medios de cultivo (Fig. 21A).

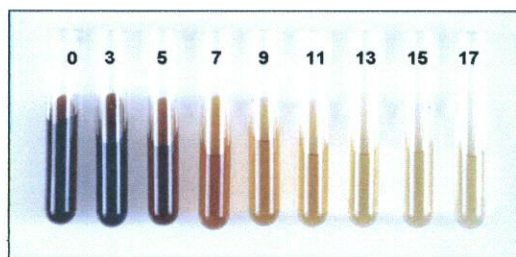


Figura 22: Decoloración del efluente producida por *C. gallica* en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. Los números indican los días de tratamiento con el hongo.

En los últimos días de la cinética la disminución del color fue más lenta, coincidiendo también con la disminución de la actividad enzimática.

Se realizó además la comparación entre los niveles de actividad lacasa detectados en los diferentes días de cultivo en medio Kirk con sorbosa suplementado con efluente y la variación de la decoloración en esos mismos días. Esta última variable se calculó como la diferencia entre la

decoloración en el día analizado respecto a la del día anterior muestreado. Al comparar las curvas que representan el comportamiento de estas variables se puede apreciar que ambas tienen gran similitud en su forma (Fig. 21B), lo que sugirió que podían estar estadísticamente relacionadas. Para confirmar esta hipótesis se realizó el análisis de regresión cuya recta se representa en la figura 21 (C,) y se calculó el coeficiente de correlación, que fue del 90,5 %. De esta manera se confirmó que en las condiciones de máxima decoloración del efluente por *C. gallica*, la misma está asociada con los niveles de actividad lacasa producida por el hongo.

Los zimogramas realizados en las muestras de diferentes días de tratamiento, mostraron un patrón de bandas idéntico al encontrado en los anteriores ensayos de decoloración en medios líquidos (Fig. 23 A). En los días de máxima actividad lacasa y decoloración (días 5 y 7 de tratamiento) aparecieron claramente diferenciadas dos bandas de más intensidad que también pudieron apreciarse más tenues en los días sucesivos de la cinética. En el día 3 de incubación apareció una banda muy tenue con un peso molecular aparente más bajo, que coincidió en el tiempo con la coloración del medio al igual que ocurrió en los anteriores ensayos en medio líquido.

A su vez, de los zimogramas puede deducirse que si bien en este ensayo se detectaron niveles de actividad lacasa bastante más altos que en las anteriores cinéticas, el patrón de bandas del zimograma no fue mucho más intenso que en los anteriores, por lo podría deducirse que probablemente los valores más bajos de actividad enzimática, de los anteriores estudios, pudieron ser debidos a la interferencia causada por los compuestos tánicos, al usar ABTS como sustrato, en la cuantificación de la actividad.

Con el objetivo de ver si estas dos bandas intensas, detectadas en el zimograma los días 5 y 7 de tratamiento, eran proteínas distintas o la misma se realizó un isoelectroenfoco con estas bandas. En la figura 23 B pueden verse los resultados de este isoelectroenfoco en el que se muestra como las cuatro bandas poseen el mismo punto isoeléctrico por lo que probablemente sean isoformas de la misma proteína y no proteínas distintas.

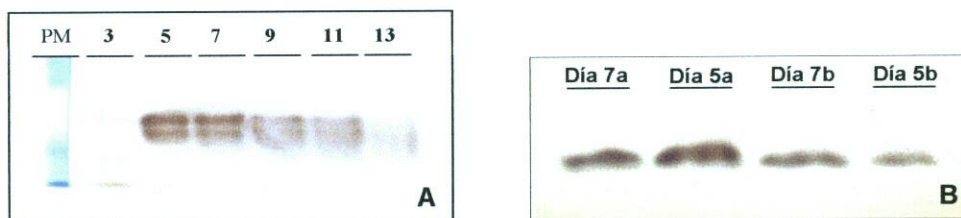


Figura 23: Zimograma de actividad lacasa, en condiciones no desnaturizantes y revelados con 2,6-dimetoxifenol, producida por *C. gallica* en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. PM: marcador de peso molecular (A). Isoelectroenfoque de las bandas más intensas detectadas en los días 5 y 7 del zimograma. a: bandas de mayor peso molecular. b: bandas de menor peso molecular (B).

En cuanto al crecimiento de *Coriopsis gallica* en este medio Kirk con sorbosa, se observó como seguía un comportamiento igual al de anteriores ensayos. En estas condiciones, el hongo creció mejor en el medio que tenía 40% de efluente que en el medio control sin efluente (Fig. 24). Sin embargo, en este caso el micelio no desarrolla tantas protuberancias o agregados de micelio en forma de estrella, como se había visto en los cultivos del hongo en medio Kirk sin fuente de carbono y en presencia del efluente.

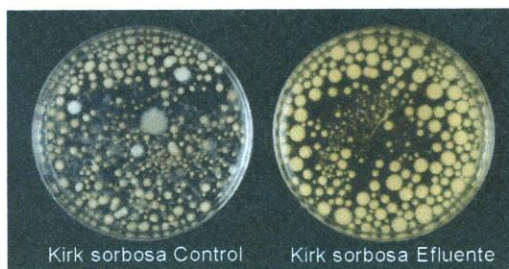


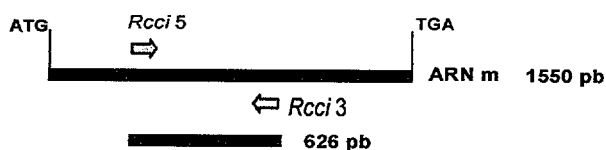
Figura 24: Diferencias en el tamaño y la morfología de los agregados de micelio de *Coriopsis gallica* crecido en medio Kirk sorbosa control y con efluente.

Hay que hacer constar que en todos estos ensayos realizados en medios líquidos, además de la actividad lacasa fueron medidas espectrofotométricamente las actividades de las enzimas ligninolíticas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en las muestras de los medios de cultivo. En ninguno de los cultivos realizados se detectó actividad de ninguna de estas enzimas, aunque por ello, no puede descartarse el papel de estas en la decoloración del efluente, pues debe de tenerse en cuenta que para realizar las mediciones de su actividad en presencia del mismo, fue necesario realizar diluciones del medio de cultivo, debido a la fuerte interferencia del color en las mediciones espectrofotométricas.

3.3. Expresión del gen *cglcc1* de *Coriopsis gallica* en condiciones de decoloración del efluente.

A partir de los estudios bioquímicos realizados hasta el momento se evidencia que existen numerosos factores que inciden sobre los niveles de la actividad lacasa producida por *Coriopsis gallica*, en diferentes condiciones de cultivo. En los medios de cultivo suplementados con efluente se detectaron los valores más altos de esta actividad enzimática, y se demostró que estaba asociada con la decoloración. Por este motivo se consideró de interés estudiar el posible efecto inductor del efluente sobre la lacasa, a nivel génico, mediante el análisis de la expresión del gen *cglcc1* en condiciones de alta decoloración. Se aplicó la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) por sus ventajas respecto al método tradicional de Northern Blot, al permitir el análisis simultáneo de gran cantidad de muestras con elevada especificidad, rapidez y sensibilidad.

Se utilizaron los ARN extraídos de cuatro días diferentes, a partir de la detección de la máxima actividad lacasa, en la cinética realizada en medio Kirk con sorbosa, como fuente de carbono y con 40% de efluente. Se escogió este experimento por ser aquel en el que se habían obtenido los más altos niveles de actividad lacasa y buenos porcentajes de decoloración del efluente (apartado 3.2.2.3.2. de resultados). De los ARN totales extraídos se purificaron los ARN mensajeros con el fin de eliminar, de las muestras, los polifenoles del efluente que pueden causar interferencias en la



Cebador corriente arriba *Rcci 5*: GATGTTGACGACGATAGCAC

Cebador corriente abajo *Rcci 3*: AAAGGAGAGCCGTTGACCAA

Figura 25: Cebadores utilizados en los estudios de expresión del gen *cglcc1* de *C. gallica*. El diseño se realizó a partir de la secuencia del ADNc de este gen.

reacción de RT-PCR. Se realizó además el mismo análisis con las muestras control preparadas a partir del micelio crecido en medio Kirk con sorbosa y sin efluente, sólo que en este caso se trabajó con ARN total.

A partir de las secuencias del ADNc del gen *cglcc1* de *C. gallica*, se diseñaron los cebadores (*Rcci 5* y *Rcci 3*), para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 626 pares de bases de la región interna de este gen (Fig. 25).

Para realizar la comparación de los niveles de expresión del gen *cglcc1*, en las distintas reacciones, se hicieron las correcciones correspondientes a cada muestra mediante la amplificación de una banda de aproximadamente 500 pares de bases del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Coriopsis gallica* (*gpd1*) (número de acceso del GenBank: AF297874) que se utilizó como control interno. Para amplificar el fragmento de este gen

constitutivo se utilizaron cebadores específicos, diseñados en nuestro laboratorio (gentileza de Howard Junca).

El análisis cuantitativo de los niveles de transcritos se realizó por densitometría de los productos de PCR detectados en los geles de agarosa después de la tinción con bromuro de etidio. Las cantidades de los transcritos se expresaron en unidades arbitrarias.

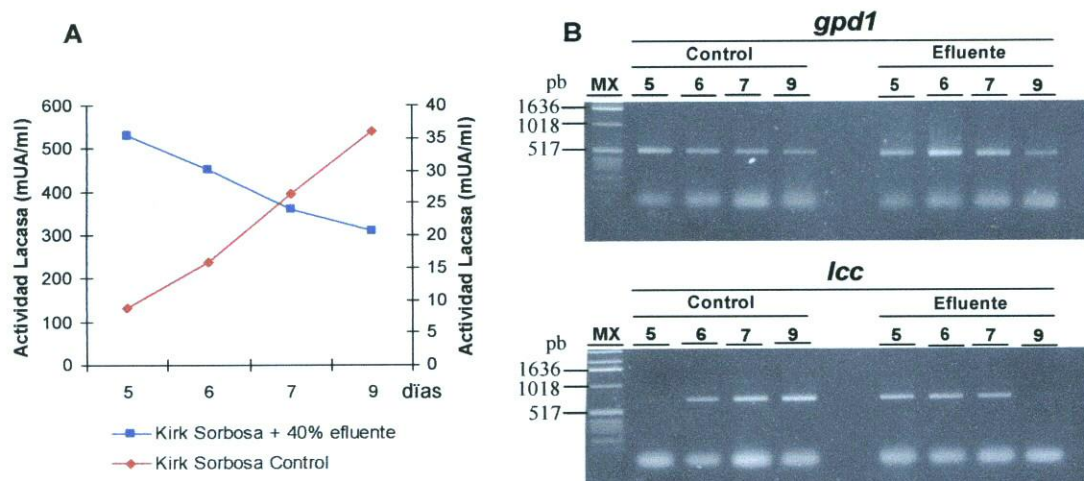


Figura 26: Efecto de la adición de efluente de la industria cervecera sobre la actividad lacasa (A) y los niveles de transcritos del gen *cglcc1* de *Corioloopsis gallica* (B) en cultivos del hongo en medio Kirk con sorbosa (control) y medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. Se tomaron muestras de medio de cultivo y micelio en diferentes días de la cinética. *lcc*: Amplificación con cebadores internos específicos para gen de lacasa *cglcc1*; *gpd1*: Amplificación con los cebadores específicos para un fragmento del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*gpd1*). MX: Marcador de peso molecular.

Al observar las curvas que representan los valores de actividad lacasa en el medio extracelular, en diferentes días del cultivo de *C. gallica* (Fig. 26A), puede apreciarse el gran aumento de esta actividad en el medio Kirk con 40% de efluente por lo que la inducción asociada al efluente resulta obvia. La máxima actividad lacasa en este medio fue alcanzada el quinto día de incubación mientras que en el medio control se obtuvo en el día 11 y fue doce veces menor.

La inducción causada por el efluente se manifestó también de manera notable a nivel de la transcripción del gen *cglcc1* de *C. gallica*, como puede observarse en la figura 26 (B), en el día 5 del tratamiento. La actividad lacasa, detectada en el medio extracelular, fue disminuyendo desde el día 5 hasta el último día de incubación, al igual que el nivel de transcritos (Fig. 27). Sin embargo, en el día 9 de incubación, sigue existiendo una alta actividad lacasa en el medio de cultivo y no se produjo transcripción de este gen, lo que sugiere que esta actividad lacasa se mantuvo en el medio.

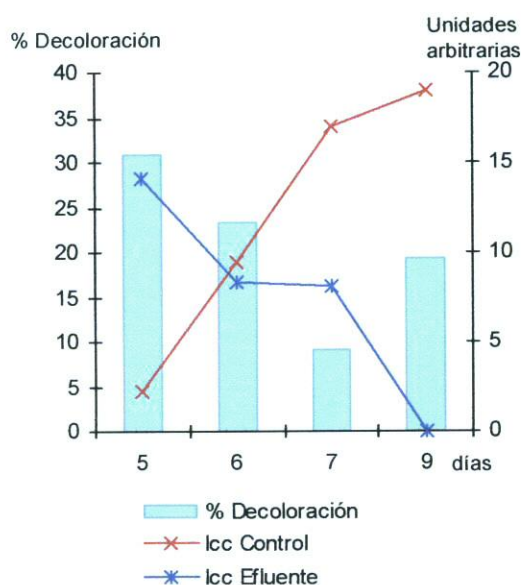


Figura 27: Cantidades relativas de transcritos del gen *cglcc1* y porcentaje de decoloración en diferentes días del cultivo de *C. gallica* en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente. Los cálculos se realizaron mediante cuantificación densitométrica de los correspondientes productos de PCR. Las unidades arbitrarias expresan la proporción entre las cantidades de transcritos del gen *cglcc1* y las del gen que codifican para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gpd1*), es decir: $\text{lacasa}/(\text{GPD1}_{\text{muestra}}/\text{GPD1}_{\text{media}})$.

En la curva que representa el nivel de los transcritos de este gen (Fig. 27) se observa una gran diferencia en el nivel de estos transcritos en el día 5 de incubación, siendo muy superiores en el medio que contenía efluente con respecto al control. Tanto en presencia del efluente, como en el medio control, la actividad lacasa extracelular estuvo significativamente asociada con los niveles de transcritos del gen de lacasa *cglcc1*. El coeficiente de correlación entre las dos variables fue 87,8%, en presencia de efluente y 99,1% en el control.

Además, puede observarse como este alto nivel de transcritos, en el medio con efluente, coincide con la máxima decoloración y que la disminución en la velocidad de decoloración

coincidió con la pérdida de actividad lacasa. Esta asociación se confirmó mediante el análisis de la correlación entre los niveles de transcritos y la velocidad de decoloración. El coeficiente de correlación fue del 87,4%, lo que significa que en esa medida la variación de la decoloración dependió de la actividad lacasa.

3.4. Análisis de la degradación del efluente por pirólisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas (Pi-CG-EM).

De los ensayos realizados con *Corioloopsis gallica* para comprobar su capacidad de crecimiento y decoloración en medio 7 líquido, se tomaron muestras del cultivo con el fin de analizar mediante la técnica de Pi-CG-EM, los cambios asociados a esta degradación. Se compararon las muestras tomadas en el día cero de incubación (medio inoculado con el hongo, que se utilizó como control) con las recogidas en el último día de tratamiento con el hongo (día 12). La preparación de las muestras para pirólisis fue realizada tal y como se describe en el apartado 2.1.3. de Materiales y Métodos.

Los pirogramas representativos de las muestras de efluente control y biotratadas se muestran en la figura 28. Los números de los picos correspondientes a los compuestos y sus áreas relativas pueden verse en la Tabla 7. Los productos más volátiles, que eluyen por debajo del scan 200, no

fueron considerados en este análisis ya que principalmente representan compuestos de bajo peso molecular producidos por la pirólisis, no siendo marcadores específicos de ningún precursor en particular.

Tabla 7: Productos de pirólisis del tratamiento con *Corioloopsis gallica* de cultivos con distintas concentraciones de efluente.

N°*	Nombre	Scan	PM	Área Relativa **					
				V ₁ (20% Efluente)		V ₂ (40% Efluente)		V ₃ (60% Efluente)	
				D ₀	D ₁₂	D ₀	D ₁₂	D ₀	D ₁₂
1	Metilpirrol	213	81	8,28	8,33	3,19	2,2	0,58	1,14
2	Estireno	292	104	4,25	7,28	1,69	3,07	2,23	2,05
3	Fenol	612	94	34,03	26,4	36,27	29,23	27,5	19,63
4	3-Metilfenol	866	108	3,56	4,84	2,94	3,37	1,39	3
5	4-Metilfenol	929	108	27,55	26,96	23,49	23,13	20,31	21,21
6	Guaiacol	935	124	4,16	1,63	5,94	6,42	5,21	4,78
7	4-Etilfenol	1154	122	2,73	4,38	4,08	4,21	3,25	4,29
8	4-Metilguaiacol	1188	138	1,25	0,53	2,53	2,31	3,84	6,06
9	4-Vinilfenol+Catecol	1278	230	7,74	9,59	13,66	16,06	24,91	23,83
10	4-Etilguaiacol	1361	152	1,44	0,69	1,65	1,42	3	2,99
11	Indol	1391	117	2,69	7,86	1,64	5,48	1,46	3,51
12	4-Vinilguaiacol	1426	150	2,21	1,51	2,56	2,73	5,53	6,81
13	2,6-Dimetoxifenol	1496	154	0,1	0	0,34	0,36	0,78	0,68

* En todos los análisis realizados por Pi-CG-EM, cada compuesto se designó siempre con un mismo número, para mantener la homogeneidad en cuanto a la numeración.

** Área relativa. Las diferencias respecto al 100% se deben a la presencia de compuestos desconocidos o minoritarios.

Los productos mayoritarios de pirólisis identificados en las muestras fueron fenol (3) y 4-metilfenol (5) y otros picos principales fueron guaiacol (6) y el producido por la coelución de 4-vinilfenol y catecol (9), esto se corresponde con los compuestos mayoritarios de pirólisis detectados en la caracterización del efluente.

El área relativa, de los 13 compuestos detectados, fue diferente según la concentración del efluente. Así, en concentraciones de 20 y 40%, la mayoría de los productos de pirólisis tuvieron un comportamiento similar en cuanto al aumento o disminución de su área relativa en el tiempo de biotratamiento con el hongo. Sin embargo, en las muestras V₃ con 60% de efluente, la variación de estas cantidades relativas fue diferente. En esta concentración de efluente se habían mostrado, también, diferencias en cuanto a decoloración y disminución de la DQO, además que un posible efecto inhibitorio del crecimiento del hongo.

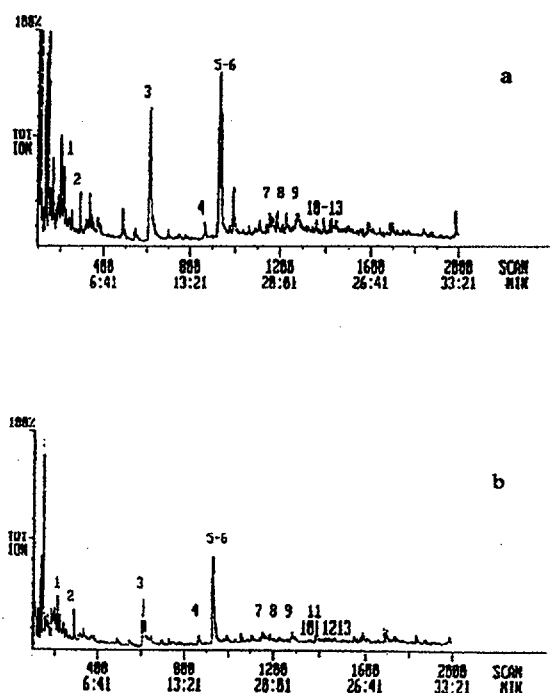


Figura 28: Pirogramas de las muestras V₁, conteniendo 20% de efluente, antes (a) y después de 12 días de tratamiento con *Corioloopsis gallica* (b). La designación de los picos se muestra en la Tabla 7.

Entre los productos de pirólisis que disminuyeron con el tiempo de tratamiento con *Corioloopsis gallica* se encuentra el fenol (3), que redujo, su área relativa, en las tres concentraciones del efluente ensayadas (Tabla 7, Fig. 28). Los valores de la reducción del fenol fueron de 22,4, 19,4 y 28,6% en día 12 de biotratamiento, en las muestras V₁, V₂ y V₃ respectivamente. El producto de pirólisis 4-etilguaiacol (10) también disminuyó en las tres variaciones de efluente siendo sus valores de 50% (V₁), 14% (V₂) y 0,3% (V₃). Además, se observó una reducción de los valores del área relativa para el guaiacol (6) en día 12 de la incubación, en las muestras V₁ (60,8%) y V₃ (8,2%), para el 4-metilguaiacol (8) en V₁ y V₂ en valores de 57,6% y 8,7%, respectivamente y para el 4-vinilguaiacol (12) que disminuyó (31,6%) en día 12 de biotratamiento con el hongo en la muestra V₁.

Todos estos compuestos han sido descritos como productos típicos de pirólisis de taninos, en diferentes orígenes, como muestras de vino (Galletti y col, 1995), y de semillas de sorgo o cebada (Galletti y Reeves, 1992). A su vez, también han sido detectados en la pirólisis de lignina, paja y madera (Martín y col., 1979; Ralph y Hatfield, 1991; Terrón y col., 1996). Esto es un resultado esperado porque la lignina y los taninos comparten una serie de características estructurales comunes de polifenoles (William y col., 1986).

Es importante resaltar que no se observó ninguna adhesión de color oscuro en el micelio del hongo. Por esta razón, la reducción de estos productos de pirólisis puede ser debida a la capacidad de *Corioloopsis gallica* de degradarlos. Las variaciones en las áreas relativas de los productos de pirólisis, en las diferentes muestras y días de tratamiento, no mostraron una tendencia uniforme; por lo tanto, estas son, de algún modo, indicativas de que ocurren modificaciones en la estructura de los taninos precipitados, probablemente debido a la degradación enzimática producida por el hongo.

Los productos de pirólisis que aumentaron su área relativa con el tiempo de biotratamiento fueron, en su mayoría, productos derivados de aminoácidos. Entre estos productos se detectaron los siguientes: metilpirrol (1), estireno (2), indol (11) y el compuesto 3-metilfenol (4) que puede ser atribuido tanto a fenoles como a proteínas. El metilfenol (4) ha sido descrito como producto de pirólisis del aminoácido tirosina, el indol (11) del triptófano, y el estireno (2) de fenilalanina (Chiavari y Galletti, 1992; Stankiewicz y col., 1997). De entre ellos, el indol fue en el que se observó un mayor aumento de área relativa siendo sus valores de 66% en V_1 , 70% en V_2 y 58% en V_3 . Las enzimas extracelulares producidas por *C. gallica* durante la cinética de biotratamiento del efluente, pudieron coprecipitar con los taninos, a este pH ácido utilizado para la preparación de las muestras de la pirólisis, y puede explicar el incremento de estos productos de pirólisis derivados de aminoácidos.

Resulta interesante resaltar el aumento que se produjo en el producto de pirólisis 4-etilfenol (7) que se observó en todas las muestras analizadas, en el último día de tratamiento con el hongo y que fue de 37% en V_1 , 3% en V_2 y 25% en V_3 . Este compuesto ha sido descrito como un producto de pirólisis de los taninos presentes en muestras de vinos, como resultado de la fisión del anillo heterocíclico de estos (Galletti y col., 1995), por lo que el aumento en su área relativa sugiere una modificación, por acción del hongo, de los taninos presentes en la muestra. En las muestras V_3 , con 60% de efluente, se produjo un incremento del área relativa de productos como 4-metilfenol (4,5%) y 4-metilguaiacol (36,6%), que también han sido descritos en la pirólisis de muestras de vino, procedentes de la ruptura de los anillos heterocíclicos de los taninos presentes en las mismas.

El catecol y 4-vinilfenol (9), son productos de pirólisis que eluyen conjuntamente y la suma de sus áreas relativas tiende a aumentar con el tratamiento con el hongo, en las muestras V_1 y V_2 . El catecol ha sido descrito como un producto típico de la pirólisis de taninos en vinos (Galletti y col., 1995) y como un compuesto diagnóstico de la pirólisis de taninos condensados de origen natural (Galletti y Reeves, 1992).

En general, se observaron cambios en las muestras tratadas con *Corioloropsis gallica* con respecto a las controles. Entre estos cambios se encontraron, por un lado la disminución de las áreas relativas de algunos productos de pirólisis que puede estar asociada a una degradación de los compuestos polifenólicos del efluente, por acción del hongo, y por otro lado, se observó el incremento en las cantidades relativas de otros compuestos, asociado al aumento de proteínas en los medios de cultivo y a las modificaciones en la estructura de los taninos presentes en el efluente.

3.5. Decoloración del efluente con caldos enzimáticos de *Coriolopsis gallica*.

Después de estudiar los aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática del efluente, procedente de la industria cervecera, con *Coriolopsis gallica*, no quedan dudas de la importancia de la enzima lacasa de este basidiomiceto en el proceso. Sin embargo, nos falta por analizar un último aspecto, de gran interés desde el punto de vista de una posible aplicación práctica de esta enzima, y es el estudio de la decoloración del efluente con caldos enzimáticos ricos en actividad lacasa.

Para la obtención de un caldo de cultivo con una alta actividad lacasa, necesario para su posterior aplicación en la decoloración del efluente, se siguió el procedimiento desarrollado por Carbajo (2001). Se inocularon matraces con medio Kirk con el hongo y los cultivos se dejaron crecer durante 5 días, transcurridos los cuales, se añadió al medio de cultivo una solución de ácido tánico (100 μM) como inductor de la actividad lacasa. A los dos días de incubación, después de añadir el ácido tánico, se alcanzó un alto nivel de actividad lacasa. Entonces se separó el caldo del micelio mediante filtración y se procedió como se describe en el apartado 2.9. de Materiales y Métodos.

Los estudios de decoloración del efluente se realizaron con mezclas de 10 ml de volumen final, con la cantidad necesaria para tener 1 unidad de actividad lacasa y el efluente a una concentración del 20%. El efluente fue tratado previamente con HCl concentrado para bajar su pH a 6,00, y a continuación fue esterilizado. Se ajustó a 4,00 el pH de las mezclas, en condiciones estériles y se incubaron a 37 °C en agitación (200 r.p.m.). Estas mezclas fueron preparadas por duplicado y se muestran los resultados de la muestra A y la muestra B (Fig. 29). Además se prepararon controles, con la misma composición que las mezclas en estudio, que se hirvieron durante 10 minutos para inactivar las enzimas y se incubaron en las mismas condiciones, de esta manera se podía valorar si el cambio de color estaba asociado exclusivamente a una acción enzimática, o intervenían además factores físico-químicos. Se midió el pH de las mezclas durante todo el tratamiento y éste se mantuvo en 4,00 en todos los casos. Se analizó, además, el cambio de color asociado a la degradación enzimática del efluente, a través de medición de las unidades de color, tal y como se describe en el apartado 2.1.1.3. de Materiales y Métodos. También se midieron los cambios en el espectro de absorción de las muestras en el rango de longitudes de onda entre 280 y 800 nm. Es importante aclarar, que en el caldo se analizaron las actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa no detectándose ninguna de estas enzimas.

En la figura 29 se aprecia que en el control no se produjo ningún cambio de color durante todo el tiempo del experimento. En cambio, en el efluente tratado con el caldo enzimático el color disminuyó hasta un 11%, aproximadamente, en la muestra A y un 8% en la muestra B, en el

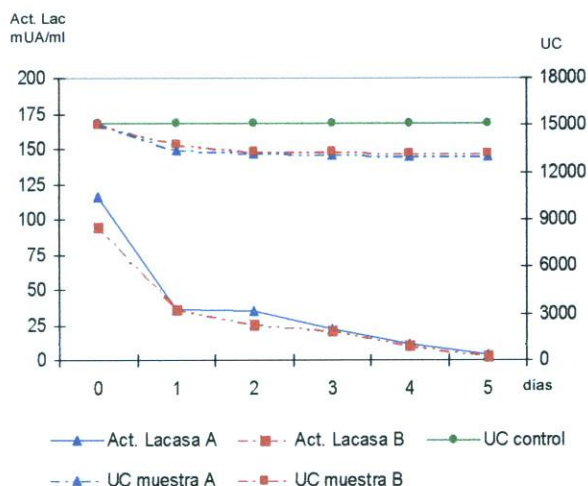


Figura 29: Decoloración del efluente con caldo enzimático de *Coriopsis gallica* obtenido a partir de cultivos con alta actividad lacasa. Se comparan las unidades de color (UC) en la mezcla con enzima de dos muestras (A y B) y en el control. Se muestra además el cambio en los valores de actividad lacasa en las mezclas con enzima (A y B) durante el tiempo de incubación.

lacasa en las mezclas tratadas. La actividad lacasa disminuyó bruscamente en el primer día de tratamiento (Fig. 29), siendo su reducción de 70% para la muestra A y 61% para la muestra B. A partir de ese momento, la actividad detectada presentó valores muy bajos, llegando incluso a desaparecer en el día cinco de incubación, en ambas muestras.

En resumen, podemos decir, que existe una aparente relación entre la actividad lacasa y la decoloración del efluente, ya que la mayor pérdida de color ocurrió durante las primeras horas de tratamiento cuando la actividad lacasa fue mayor, y además, al disminuir rápidamente esta actividad, la decoloración dejó de producirse. Por otra parte, es evidente que la actividad de la enzima durante el tiempo de incubación a 37 °C, y en presencia de efluente no permaneció muy estable, disminuyendo aproximadamente un 80% respecto al valor inicial, en ambos casos, en el día 3 de incubación.

primer día de tratamiento y esta decoloración coincidió con la disminución de la absorción de las mezclas en el espectro visible, como se muestra en la figura 30. La decoloración fue rápida en estas primeras 24 horas de tratamiento, sin embargo, a partir de aquí el color disminuyó muy lentamente, no mostrando apenas variación en los últimos días de incubación. La decoloración al final del tratamiento fue de 13,7% para la muestra A y de 12,2% para la muestra B.

Debe notarse que la disminución en la velocidad de decoloración coincidió claramente con la pérdida de actividad

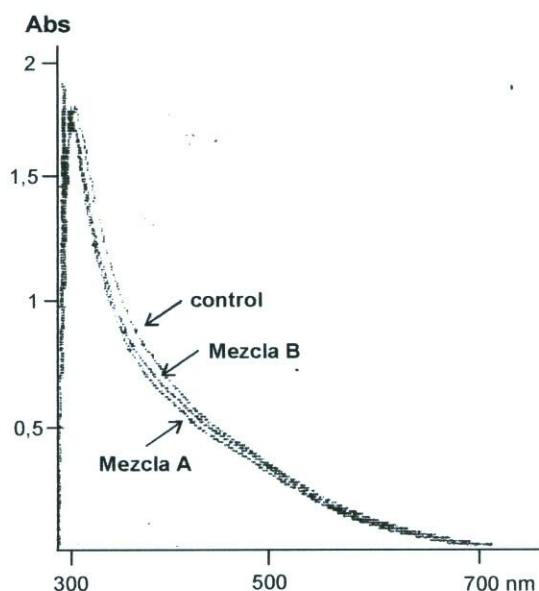


Figura 30: Cambios en el espectro visible de absorción, en el primer día del experimento, debidos al tratamiento del efluente con caldo enzimático de *Coriopsis gallica* obtenidos a partir de cultivos con alta actividad lacasa.

3.6. Expresión heteróloga de un gen de lacasa de *Coriolopsis gallica* en *Saccharomyces cerevisiae*.

En los estudios realizados hasta ahora se ha visto como *Coriolopsis gallica* muestra una buena capacidad de decolorar el efluente en estudio y se ha observado una relación entre la actividad lacasa con la degradación de este efluente.

Con objeto de poder realizar un estudio de esta relación y de poder obtener niveles rentables de esta enzima, con fines a su posible aplicación biotecnológica, se decidió poner a punto un sistema de expresión heteróloga de este gen de lacasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura fue escogida como hospedador para la expresión del gen, principalmente, por ser la levadura utilizada en el proceso de fabricación de la cerveza, de donde procede el efluente, con lo cual facilitaría el desarrollo de futuras aplicaciones. Además, esta levadura es de fácil manejo con métodos microbiológicos, está muy estudiada a nivel genético y molecular, y con ella se han alcanzado grandes éxitos en la expresión de proteínas, incluyendo la expresión de lacasas de hongos basidiomicetos.

3.6.1. Síntesis, clonaje y secuenciación del ADNc del gen *cglc1* de *Coriolopsis gallica*.

Para la síntesis del ADNc del gen *cglc1* de *Coriolopsis gallica*, se cultivó el hongo en medio Kirk con alcohol veratrílico, a 28°C, en agitación y durante 7 días. Se extrajo el ARN total del hongo recogiendo el micelio por filtración, seguido de una congelación inmediata en nitrógeno líquido y su posterior liofilización. La extracción de ARN a partir del polvo del micelio liofilizado, se realizó como se describe en el apartado 2.10.1.2.1. de Materiales y Métodos.

Para la realización de los estudios de expresión del gen *cglc1*, en medios que contenían efluente, fue necesario hacer la purificación del ARNm, según se describe en el apartado 2.10.3 de Materiales y Métodos. Esto fue debido a que al aislar ARN total a partir de cultivos con efluente, éste presenta polifenoles que pueden inactivar las enzimas utilizadas en las reacciones de transcripción reversa y PCR.

Mediante la reacción de la transcripción reversa se sintetizó la primera cadena de ADN complementario (ADNc), utilizando como molde ARN total o, en el caso de las muestras con efluente, el ARNm purificado.

En la reacción de PCR, para sintetizar la segunda cadena y amplificar los ADNc sintetizados mediante la reacción de la transcriptasa reversa, se utilizaron cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del gen que codifica para el gen de lacasa (*cglc1*) de *Coriolopsis gallica*. Estos

cebadores fueron diseñados tomando como referencia la secuencia del ADN genómico del gen *cglcc1*, publicada en el Gen Bank con el número de acceso AY017340. A estos cebadores se les unió una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Bgl* II, de manera que el fragmento de ADN amplificado pudiera ser clonado en el vector de expresión pYES 2.

La secuencia de estos cebadores fue la siguiente:

Cebador corriente arriba: *lcc5* 5'-GAAGATCTTCATGCTGCACACTCGCACTCG-3'

Cebador corriente abajo: *lcc3* 5'-GAAGATCTTCGGGTTCTCCGCGTAGTAGGTCGG-3'

En negrilla aparecen marcadas las secuencias de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Bgl* II. La temperatura de anillamiento utilizada en la reacción de PCR con estos cebadores fue de 60 °C.

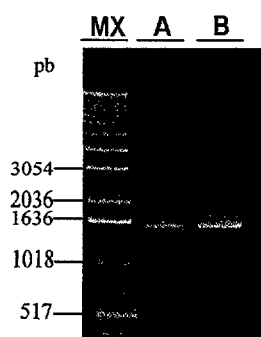


Figura 31: Amplificación por PCR del ADNc del gen *cglcc1* de *Coriopsis gallica*. **MX:** Marcador de peso molecular. **A y B:** Resultado de las reacciones de amplificación a partir de dos muestras diferentes.

Como resultado de esta PCR se obtuvo una sola banda de tamaño aproximado de 1550 pares de bases, que coincidió con el esperado, según la secuencia del ADNc, estimada a partir del ADN genómico clonado por Calvo (1995) (Fig. 31).

El producto de PCR, correspondiente a la banda de ADNc, se purificó a partir de un gel preparativo de agarosa al 1% y se clonó en el vector de expresión pYES2. De los clones positivos se seleccionaron tres de ellos, que fueron secuenciados por ambas cadenas del inserto de ADNc. En la figura 32 se representa el alineamiento correspondiente a las secuencias del ADNc sintetizado por RT-PCR y el ADN genómico del gen *cglcc1* de *Coriopsis gallica*.

3.6.2. Confirmación de la existencia de un nuevo gen de lacasa en *Coriopsis gallica*.

Al analizar la secuencia del ADN complementario del gen de lacasa de *C. gallica*, obtenido a partir de RT-PCR, se detectó que ésta no coincidía exactamente con la secuencia codificante del gen *cglcc1* de *Coriopsis gallica* deducida a partir del análisis del ADN genómico (AY017340). Se encontraron 9 diferencias en los nucleótidos, que se traducirían en la aparición de 7 cambios en los aminoácidos de las proteínas correspondientes.

295 ATGCTGCACACTCGCACTCGTCTTGGGAACGTCCTCGCCCTCCTCAGCCT 344	1445 tcgttgagcttgaacaggggaactgtgaaggctaaattacgcccgtcagCTT 1494
1 ATGCTGCACACTCGCACTCGTCTTGGGAACGTCCTCGCCCTCCTCAACCT 50	807CTT 810
345 CCTCGGCACGGGATGGGAGCGATTGGCCCCAAGACTGACCTGCACATTG 394	1495 GAAGCAAACACAGCCAAAGGGCACTACTGGATGCGCGGCAACCCAAACCA 1544
51 CCTCGGCACGGGATGGGGAACGATTGGCCCCAAGACTGACCTGCACATTG 100	811 GAAGCAAACACAGCCAAAGGGCACTACTGGATGCGCGGCAACCCAAACCA 860
395 TGAACAAGGTCATCGCACCCGATGGCTTCCTCGCGACACTATCCTTGCT 444	1545 CGCAAACTTTGTGGCTTTGAGAACGGTATCAACTCGGCCATCCTCCGCT 1594
101 TGAACAAGGTCATCGCACCCGATGGCTTCCTCGCGACACTATCCTTGCT 150	861 CGCAAACTTTGTGGCTTTGAGAACGGTATCAACTCGGCCATCCTCCGCT 910
445 GGGGAACCTTCCCGGTCCTCTCATCTGGCAAAACGgtatggacct 494	1595 ACAGGGGCGCACCGGTGCGAGAGCCGAATACGACCCAGACGCCGAGCAAA 1644
151 GGGGAACCTTCCCGGTCCTCTCATCTGGCAAAACG..... 188	911 ACAAGGGCGCACCGGTGCGAGAGCCGAATACGACCCAGACGCCGAGCAAA 960
495 cgacctggagaatctgctgcccactcacatattccctctgtagGGCGATC 544	1645 AAGCCGCTCTTGGAGACTAACTGCACCCCTTGACAAAGCAGGCTGTTg 1694
189GGCGATC 196	961 AAGCCGCTCTTGGAGACTAACTGCACCCCTTGACAAAGCAGGCTGTT. 1008
545 GCTTCTCATCGATGCTCTACGACGACTGACCAACGACTATGTTGAGC 594	1745 attttccagCCCGGAAGCCGACCCCTTGGCGGGCGAGCTGAACATCAA 1794
197 GCTTCTCATCGATGCTCTACGACGACTGACCAACGACTATGTTGAGC 246	1009CCCGGAAGCCGACCCCTTGGCGGGCGAGCTGAACATCAA 1049
595 CCAACGAGCATCgtgagtcactgaagccagagcccagtaactgattgttg 644	1795 CTTTGGTTCGGTGTgtacgtcgcaaatatgtgcgctctttactgaa 1844
247 CCAACGAGCATC..... 258	1050 CTTTGGGCTCGGTGTT..... 1065
645 accatgaggtctgcaactgtagCATTGGCATGGGTTGTTCCAGCATACTA 694	1845 cctctttggtgacacattgctctagGACGTCAACGAGGCTTGTTCCT 1894
259CATTGGCATGGGTTGTTCCAGCATACTA 286	1066GACGTCAACGAGGCTTGTTCCT 1088
695 CCAATTGGGCGGACGGTCCGGCGTTTGTGACGAGTGGCCCATCAGCTCT 744	1895 GGTCAACGGCTCTCCTTTTCATTCCTCCCGGACATCCCGGTCTCTCCCAA 1944
287 CCAATTGGGCGGACGGTCCGGCGTTTGTGACGAGTGGCCCATCAGCTCT 336	1089 GGTCAACGGCTCTCCTTTTCATTCCTCCCGGACATCCCGGTCTCTCCCAA 1138
745 GGACACAACCTCTTTTACAACCTCCGTTTCCAGACAGTCagtgcggtg 794	1945 TCCTCAGCGGTAACACTACTTGCACAGTCCCTGCTGCCGCCAGGGTCTGTG 1994
337 GGACACAACCTCTCTTTACAACCTCCGTTTCCAGACAGTCA..... 376	1139 TCCTCAGCGGTAACACTACTTGCACAGTCCCTGCTGCCGCCAGGGTCTGTG 1188
795 gtcaactcgtggtatattgacctggggcttetaaccactgtcgagacGG 844	1995 TATACCTGCGGCCCAACCAATCGGTGAGCTGTGATTCCGGGAGGCGT 2044
377GG 381	1189 TATACCTGCGGCCCAACCAATCGGTGAGCTGTGATTCCGGGAGGCGT 1238
845 TACTTACTGGTACCACAGCCACTTCGGGCTACAGTACTGCGATGGTCTTC 894	2045 CCTCGGCGGTCCCCATCCGTTCCACTTGCACGGtgagtcatttccggt 2094
382 TACTTACTGGTACCACAGCCACTTCGGGCTACAGTACTGCGATGGTCTTC 431	1239 CCTCGGCGGTCCCCATCCGTTCCACTTGCACGG..... 1271
895 GTGGTCCGATGCTGCTACGATCCCCATGACCCCTCAGAAGCATCTATAC 944	2145 cgtccccagCAGCGCTTCTCCGTAGTCCGACGCGAGGGAGCAGCGTTT 2194
432 GTGGTCCGATGCTGCTACGATCCCCATGACCCCTCAGAAGCATCTATAC 481	1272GCAGCGCTTCTCCGTAGTCCGACGCGAGGGAGCAGCGTTT 1312
945 GATGTTGACGAGCggtgggtgatacagtcgagcagtcagtcctttgtgagac 994	2195 ACAACTACAAGAACCCCGTCCAGCGGACACCCGTGAGCATCGCGGATTG 2244
482 GATGTTGACGAGC..... 492	1313 ACAACTACAAGAACCCCGTCCAGCGGACACCCGTGAGCATCGCGGATTG 1362
995 tcatggccgtccatagATAGCACTGTGATTACTCTTTCTGACTGGTACCA 1044	2245 ACCGACAACGTCACCATCCGCTCTCTGtgagtcgtctccctcttctctc 2294
493ATAGCACTGTGATTACTCTTTCTGACTGGTACCA 528	1363 ACCGACAACGTCACCATCCGCTCTCTC..... 1389
1045 TGTGCTGCTGCGGAGCGTCCCGTCCCAACgtatgcgcttatgacctc 1094	2345 cctctggtacagACGGACAACCCGGGACCGTGGTTCCTGCACTGCCACAT 2394
529 TGTGCTGCTGCGGAGCGTCCCGTCCCAAC..... 557	1390ACGGACAACCCGGGACCGTGGTTCCTGCACTGCCACAT 1427
1095 caacctaacctagtctgactgacgcgccatgtagTCAATCGGACAGTACGC 1144	2395 CGACTTCCACTTGAACGCGCGGCTCGCTGTCTGTTTGTGCTGAGGATCCAA 2444
558TCAATCGGACAGTACGC 575	1428 CGACTTCCACTTGAACGCGCGGCTCGCTGTCTGTTTGTGCTGAGGATCCAA 1477
1145 TCATCAACGCTTGGGCGGTGGGGAGGCGATCCTACCTCCGAGCTGGCT 1194	2445 AGGACACGGCTTCGTGAACCTGTGCCCAgtacgtgctgttctgtgtgt 2494
576 TCATCAACGCTTGGGCGGTGGGGAGGCGATCCTACCTCCGAGCTGGCT 625	1478 AGGACACGGCTTCGTGAACCTGTGCCCA..... 1507
1195 GTGATTACAGTGGAGCATGGAAGCGgttaagtttttagtgcgtcgagcgcc 1244	2495 ccccttcgaatgagtgctgacctggtctgtactacagGCTCTTGGGAAG 2544
626 GTGATTACAGTGGAGCATGGAAGCG..... 649	1508GCTCTTGGGAAG 1519
1245 gactgtcatcggatattgactgcaaccttctctcgacagGTACCGCTTCC 1294	2545 AGCTCTGCCCAGCTACTCGCGGAGAACCCG 2576
650GTACCGCTTCC 662	1520 AGCTCTGCCCAGCTACTCGCGGAGAACCCG 1550
1295 GTCTGGCCAGTCTCTCATCGATCCTTTCTTCACTTCTCCATCGACGGT 1344	
663 GTCTGGCCAGTCTCTCATCGATCCTTTCTTCACTTCTCCATCGACGGT 712	
1345 CATGACATGACCATCATCGAAGCCGACGGTGTGAACACGACGCCACTGAA 1394	
713 CATGACATGACCATCATCGAAGCCGACGGTGTGAACACGACGCCACTGAA 762	
1395 GGTGACACGCTGGATATCTTTGCTGCGCAGCGCTACTCCTTCGTgtaag 1444	
763 GGTGACACGCTGGATATCTTTGCTGCGCAGCGCTACTCCTTCGT..... 806	

Figura 32: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del ADN genómico correspondiente al gen *cglcc1* de *Coriopsis gallica* (representado en la línea superior), y el ADN complementario, sintetizado por RT-PCR (representado en la línea inferior). En minúsculas aparecen las secuencias que codifican para intrones.

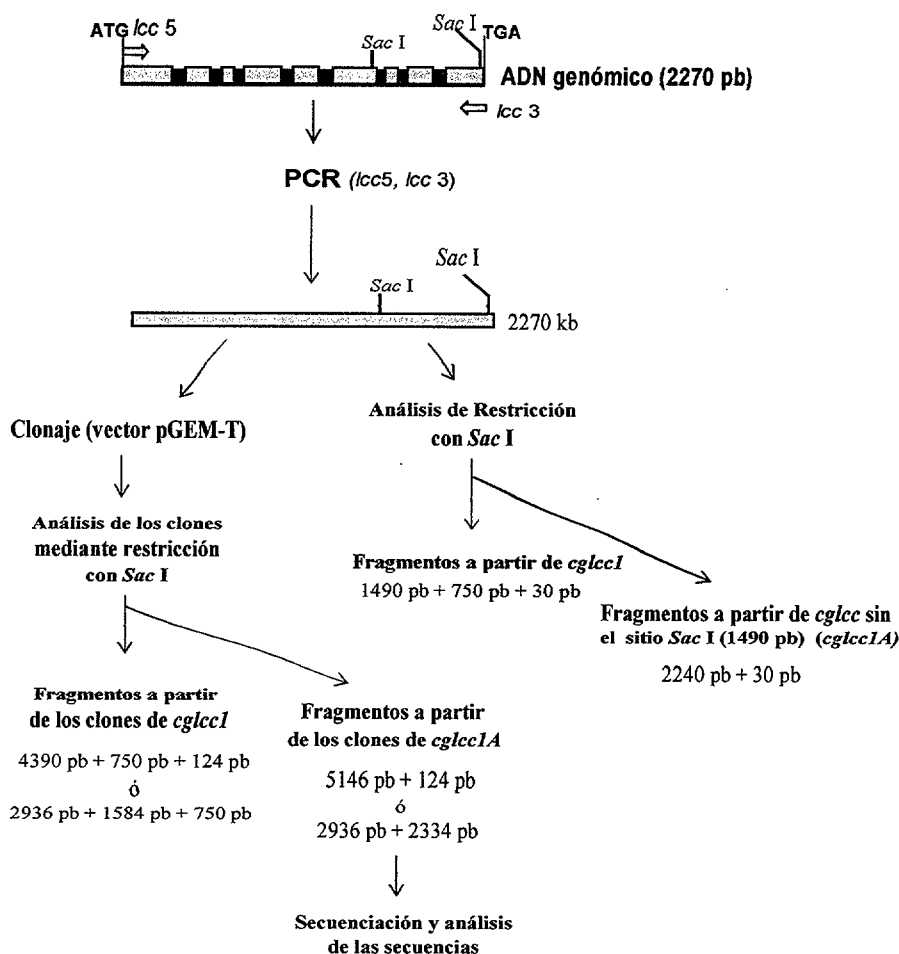
1	ATGCTGCACACTCGCACTCGTCTTGGGAACGTCTCGCCCTCCTCAACCTCCTCGGCACGGCATGGGGAACGATTGGCCC	80
1	atgctgcacactcgcaactcgctcttgggaacgtctcgcctcctcagcctcctcggcagcgcatggggagcgattggccc	80
81	CAAGACTGACCTGCACATTGTGAACAAGGTATCGCACCCGATGGCTTCCCTCGCGACACTATCCTTGCTGGGGGAACCT	160
81	caagactgacctgcacattgtgaacaaggtatcgcacccgatggcttccctcgcgacactatccttgctgggggaacct	160
161	TCCCCGGTCTCTCATCACTGGCAAAACGGGCGATCGCTTCTCATCGATGTCTACGACGACCTGACCAACGCGACTATG	240
161	tccccggtcctctcatcactggcaaaacgggcatcgcttctcatcgatgtctacgacgacctgaccaacacgactatg	240
241	TTGACGCCAACGAGCATCCATTGGCATGGGTGTTCAGCATACTACCAATTGGGCCGACGGTCCGGCGTTTGTCAAGCA	320
241	ttgacgccaacgagcatccattggcatgggtgttccagcatactaccaattgggcccagcggtccggcgcttgtcacgca	320
321	GTGCCCCATCAGCTCTGGACACAACCTTCCTTTACAACCTCCGTGTTCAGACCACTCAGGTACTTACTGGTACCACAGCC	400
321	gtgccccatcagctctggacacaacttcctttacaacttcogtgtccagaccagtcaggtacttactggtaccacagcc	400
401	ACTTCGGGCTACAGTACTGCGATGGTCTTCGTGGTCCGATCGTCGTCTACGATCCCCATGACCCCTCAGAAGCATCTATAC	480
401	acttcgggctacagtactgcatgggtcttcgtgggtccgatcgctgtacgatccccatgacctcagaagcatctatac	480
481	GATGTTGACGACGATAGCACTGTGATTACTCTTTCTGACTGGTACCATGTCTGCTGCTGCGAGCGTCCCGTCCACCTCA	560
481	gatgttgacgacgatagcactgtgattactcttctgactggtagcatgtcgctgctgagcgctcccggtccacactca	560
561	ATCGGACAGTACGCTCATCAACGGCTTGGGCGCTGGGGAGGCGATCCTACCTCCGAGCTGGCTGTGATTACAGTGGAGC	640
561	atcggacagtacgctcatcaacggcttgggcccgtgggagggcgatcctacctccgagctggctgtgattacagtggagc	640
641	ATGGAAAGCGGTACCGCTTCCGCTGGCCAGTCTCTCATGCGATCCTTCTTACGTTCTCCATCGACGGTCTATGACATG	720
641	atggaaagcggtaccgcttccgctggccagtctctcatgcatccttcttccagcttccatcgacggtcatgacatg	720
721	ACCATCATCGAAGCCGACGGTGTGAACACGCGACCACTGAAGTTCGACCACTGGATATCTTTGCTGCGCAGCGCTACTC	800
721	accatcatcgaagccgacggtgtgaacacgcgaccactgaaggtcgaccagctggatatcttctgctgagcgctactc	800
801	CTTCGTGCTTGAAGCAAACAGCCAAAGGGCACTACTGGATGCGCGCGAACCACCAACGCAAACTTTGCTGGGCTTTG	880
801	cttcgtgcttgaagcaaacagccaaagggaactactggatgcgcggaaccacaaacacgcaaaacttctgaggcttgg	880
881	AGAACGGTATCAACTCGGCCATCCTCCGCTACAAGGGCGCACCGGTGCGAGAGCCGAATACGACCCAGACGCGAGCAAA	960
881	agaacggtatcaactcgccatcctccgctacaaggcgacccggtcgagagccgaatacgaccagacgcgagcaaaa	960
961	AAGCCGCTCTTGGAGACTAACCTGCACCCCTTGACAAAGCAGGCTGTTCCCGGAAAGCCGACCCCTGGCGGCGCCGACGT	1040
961	aagccgctcttggagactaacctgcaccccttgacaaagcaggctgttcccgaaagccgaccccttggggggccgacgt	1040
1041	GAACATCAACCTTGGGCTCGGTGTTGACGTCAACGCAGGCTTGTCTTGGTCAACGCTCTCCTTTTCATCCCCCGGACA	1120
1041	gaacatcaaccttgagttcgggtgtgacgtcaacgcaggcttgttcttgggtcaacgctctcctttcattccccggaca	1120
1121	TCCCGTCTCTCCTCAATCCTCAGCGGTAACCTACTGCACAGTCCCTGCTGCCGCCAGGGGTGCTGTATACCTGCCG	1200
1121	tcccgctctcctccaatcctcagcggttaactactctgcacagtcctgctgccgccaggggtgctgtataccttgccg	1200
1201	CCCAACCAATCGGTGAGCTGTGATTCGGGGAGGCGTCTCGGGCGTCCCATCCGTTCACCTTGACCGGGCACGCTT	1280
1201	cccaaccaatcggtcagctgtgattccgggagggctcctcggcggtcccatccgttccacttgacgggacgcgctt	1280
1281	CTCCGTAGTCCGACGCGAGGGAGCAGCGTTTACAACCTACAAGAACCCCGTCCAGCGCGACCCGTGAGCATCGGCGATT	1360
1281	ctccgtagtcgacgagcgaggagcagcggtttacaactacaagaaccccgctccagcgcgacacggtgagcatcgcgatt	1360
1361	CGACCGACAACGTCACCATCCGCTTCTTACGGACAACCCGGGACCGTGGTTCTGCACTGCCACATCGACTTCCACTTG	1440
1361	cgaccgacaacgtcaccatccgcttcttcaaggacaacccgggaccggtggttctgactgccacatcgacttccacttg	1440
1441	AACGCCGGCTCTCGTGTCTGTTTGGTGGAGATCCAAAGGACACGGCCTTCGTGAACCTGTGCCAGCTCTTGAAGGA	1520
1441	aacgccggcctcgtgtctgttgggtggagatccaaaggacacggccttcgtgaacctgtgccagctcttgaagga	1520
1521	GCTCTGCCGACCTACTACGCGGAGAACCCTGTA	1554
1521	gctctgccgacctactacgcgaggaaccctgta	1554

Figura 33: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del ADN complementario del gen *cgkcc1* de *Corioliopsis gallica* (en letras minúsculas) y de otro ADNc (*cgkcc1A*) aislado por RT-PCR utilizando los mismos cebadores (en letras mayúsculas). En color amarillo se resaltan las diferencias en los nucleótidos de ambos ADNc.

En la figura 33 se muestran las diferencias encontradas al alinear el ADNc con la secuencia del ADN genómico del gen *cglcc1* de *C. gallica*. Se decidió, entonces, realizar un análisis adicional para verificar si esta secuencia correspondía a otro gen de lacasa y que los cambios en las bases no eran debidos a errores cometidos en la síntesis y amplificación del ADNc.

3.6.2.1. Análisis del nuevo gen *cglcc1A* mediante PCR-RFLP.

El hecho de que dos de estas sustituciones de nucleótidos en la secuencia de ADNc provocaran la pérdida de uno de los dos sitios de restricción para *Sac* I (el situado en la posición 1490 pb), fue aprovechado para diseñar una estrategia con el fin de confirmar la presencia de un nuevo gen de lacasa, cuya región codificante se ajustara a la secuencia de ADNc determinada en este trabajo, en el genoma de *C. gallica*.



Cebador corriente arriba: *lcc*5 5'-GAAGATCTTCATGCTGCACACTCGCACTCG-3'
Cebador corriente abajo: *lcc*3 5'-GAAGATCTTCGGGTTCTCCGCGTAGTAGGTCGG-3'

Figura 34: Estrategia para la confirmación de la existencia de un nuevo gen de lacasa (*cglcc1A*) en *Coriopsis gallica*. El análisis se basa en la pérdida en este gen de uno de los sitios de reconocimiento para *Sac* I (1490 pb), detectada en la secuencia del ADN complementario clonado.

En primer lugar se realizó la amplificación del gen *cglcc1* de *C. gallica* a partir de ADN genómico, utilizando los cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del gen (Fig. 34). Estos cebadores permiten amplificar todo el gen, obteniéndose un producto de PCR de 2270 pb, que se purificó y se sometió a un análisis de RFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) con la enzima de restricción *Sac* I. Tal y como se esperaba, parte del producto de PCR se digirió con la enzima *Sac* I produciendo 2 fragmentos del tamaño previsto: 1490 y 750 pb (en la electroforesis en gel de agarosa realizada no es posible detectar el fragmento de 30 bases que también se obtiene como resultado de esta digestión (Fig. 35 A)). Sin embargo, una parte de este producto de PCR quedó sin digerir, como debía suceder si efectivamente existiera otro gen de lacasa diferente de *cglcc1* que ha perdido el sitio de restricción *Sac* I mencionado anteriormente.

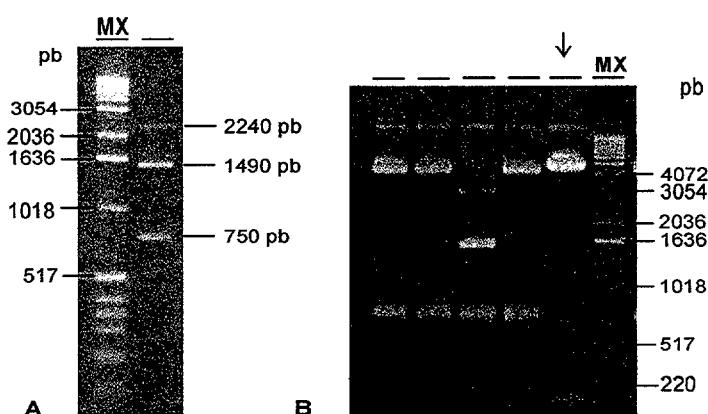


Figura 35: Análisis de la posible existencia de un nuevo gen de lacasa en *Coriolopsis gallica*. **A:** Digestión con *Sac* I del producto de la amplificación por PCR, a partir de ADN genómico total, utilizando los cebadores específicos para el gen *cglcc1*. Se obtienen dos bandas correspondientes al corte del gen *cglcc1* en el sitio *Sac* I (localizado a 1490 pb) y una banda de mayor tamaño (2240 pb) que demuestra la pérdida del sitio de corte para esta enzima en el nuevo gen. **B:** En el análisis de restricción con *Sac* I de varios clones obtenidos al clonar los productos amplificados se aprecia que una de las muestras (la señalada con flecha) tiene el patrón característico de la pérdida del sitio *Sac* I. Se seleccionó este clon para ser secuenciado y analizar si correspondía a un nuevo gen de lacasa. **MX:** Marcador de peso molecular.

Los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación del ADN genómico con los cebadores *lcc* fueron clonados en el vector pGEM-T, para su posterior secuenciación. Los clones fueron analizados mediante análisis de restricción con *Sac* I (Fig. 35 B).

En la figura 35 B se muestra el resultado del análisis de varios de estos clones, en donde uno de ellos parecía contener el gen *cglcc1A*. En la digestión correspondiente se observan dos fragmentos: uno de 5146 pb que corresponde al vector pGEM-T con gran parte del gen, y otro pequeño fragmento generado por los cortes *Sac* I en el gen y en el vector, equivalente a 124 pb tal y como ocurriría si no existiera la secuencia de corte para *Sac* I situada en la posición 1490 del gen.

Con ello se demuestra que se produjeron distintos productos en la amplificación con cebadores específicos para *cglcc1* y que las diferencias obtenidas en los patrones de restricción no fueron debidas a que se había producido una digestión parcial con *Sac* I del producto de PCR, sino a la existencia de un gen de lacasa distinto del gen *cglcc1* de *Coriolopsis gallica*, al que denominamos *cglcc1A*. Estos clones se secuenciaron por los dos extremos lo que ha permitido confirmar la existencia de varias de las sustituciones de nucleótidos detectadas en *cglcc1A*, como la correspondiente a la pérdida del sitio *Sac* I situado en la posición 1490 pb.

3.6.2.2. Caracterización de las secuencias de los ADNc de los genes *cglcc1* y *cglcc1A*.

Las secuencias de ADNc de los genes *cglcc1* y *cglcc1A* obtenidas por RT-PCR están constituidas, ambas, por 1554 pares de bases, que presentaron 9 diferencias en sus nucleótidos (Fig. 33). Estas diferencias no provocaron modificaciones en el marco de lectura, sin embargo, sí se traducirían en la aparición de 7 cambios en los aminoácidos de la proteína correspondiente deducida a partir de las secuencias codificantes (Fig. 36).

Por otra parte, la comparación de las secuencias de ADNc con la del correspondiente ADN genómico (Fig. 27), confirmó que las estructuras postuladas por Calvo (1995) y Zapico (1999), en cuanto a número y disposición de los intrones y exones de este gen son correctas.

Al realizar la traducción de las secuencias de nucleótidos a los aminoácidos correspondientes, también coincidió el número teórico de aminoácidos de las proteínas maduras codificadas por estos genes *cglcc1* y *cglcc1A*, siendo de 517 aminoácidos. Las diferencias en las secuencias de los ADNc de los genes *cglcc1* y *cglcc1A*, se encuentran no sólo en el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sac* I, sino en el péptido señal de la preproteína y en uno de los sitios potenciales de glicosilación.

La deducción de la secuencia del péptido señal se obtuvo tras analizar la proteína mediante un programa informático que pronostica los posibles sitios de corte, para el péptido señal, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) basado en los trabajos de Nielsen y colaboradores (1997) y en los de Nielsen y Krogh (1998).

Para la proteína deducida del gen *cglcc1A* de *Coriolopsis gallica* el sitio de corte se localizaría entre los aminoácidos 23 y 24, al igual que el péptido señal deducido del gen *cglcc1*, por lo que la diferencia en los aminoácidos de esta región no afectaría a la proteína madura. En lo que respecta a las demás diferencias en los aminoácidos, estas no afectan a los sitios de uniones a cobre, que son regiones muy conservadas en las lacasas, ni a las cisteínas que están relacionadas con la formación



de puentes disulfuro intramoleculares y con uniones a cobre de tipo 1 (Jönsson y col., 1995) y que también se encuentran localizadas en zonas muy conservadas de la proteína.

```

      10      20      30      40      50      60
MLETRTRLGNVLALLNLLGTAWGTIGPKTDLHIVNKVIAPDGFPRDTILAGGTFPGPLIT
      .....
MLETRTRLGNVLALLSLLGTAWGAIGPKTDLHIVNKVIAPDGFPRDTILAGGTFPGPLIT
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
GKTGDRFLIDVYDDLTNATMLTPTSIHWHGLFQHTTNWADGPAFVTQCPISSGHNFLYNF
      .....
GKTGDRFLIDVYDDLTNTMLTPTSIHWHGLFQHTTNWADGPAFVTQCPISSGHNFLYNF
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
RVPDQSGTYWYHSHFGLQYCDGLRGPIVVYDPHDPQKHLYDVDDSTVITLSDWYHVAAA
      .....
RVPDQSGTYWYHSHFGLQYCDGLRGPIVVYDPHDPQKHLYDVDDSTVITLSDWYHVAAA
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
SVPVPPQSDSTLINGLRWGGDPTSELAVITVEHGKRYRFRLASLSCDFFFTSIDGHDM
      .....
SVPVPPQSDSTLINGLRWGGDPTSELAVITVEHGKRYRFRLASLSCDFFFTSIDGHDM
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
TIEADGVNTQPLKVDQLDIFAAQRYSFVLEANQPKGNYWMRANPNHANFVGFENGINS
      .....
TIEADGVNTQPLKVDQLDIFAAQRYSFVLEANQPKGNYWMRANPNHANFVGFENGINS
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
ILRYKGAPVAEPNTTQTPSKKPLETNLHPLTKQAVPGKPHPGGADVNNINLGLGVDVNAG
      .....
ILRYKGAPVAEPNTTQTPSKKPLETNLHPLTKQAVPGKPHWRADVNNINLEFGVDVNAG
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
LFLVNGSPFIPPDIPVLLQILSGNYSAQSLPPGVVYTLPPNQSVELSIPGGVLGGPHPF
      .....
LFLVNGSPFIPPDIPVLLQILSGNYSAQSLPPGVVYTLPPNQSVELSIPGGVLGGPHPF
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
HLHGHAFSVVRSAGSSVYNYKNPVQRDTVSIGDSTDNVTIRFFTDNPGPWFLHCHIDFHL
      .....
HLHGHAFSVVRSAGSSVYNYKNPVQRDTVSIGDSTDNVTIRFFTDNPGPWFLHCHIDFHL
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510
NAGLAVVFAEDPKDTAFVNPVPSSWKELCPTTYAENP
      .....
NAGLAVVFAEDPKDTAFVNPVPSSWKELCPTTYAENP
      490     500     510

```

Figura 36: Comparación de las proteínas deducidas a partir de la secuencias de ADNc del gen *cglcc1* (línea inferior) y del ADNc del gen *cglcc1A* (línea superior) de *Corioliopsis gallica* (Identidad: 99,2%). En azul se muestra el péptido señal, en verde los sitios potenciales de glicosilación, en rojo los sitios de unión a cobre, en morado las cisteínas y, remarcados en amarillo las diferencias detectadas en los aminoácidos de las proteínas.

Como se observa en la figura 36 se sustituyen 3 aminoácidos de cadena lateral grande (triptófano (W), arginina (R) y glutámico (E)) por tres glicinas, que es el aminoácido de estructura más sencilla, puesto que carece de cadena lateral. Además, estas tres sustituciones por glicina

ocurren en zonas muy próximas de la cadena aminoacídica. Debido al pequeño tamaño de la glicina, este aminoácido permite una gran flexibilidad en la rotación del enlace aminoacídico y por tanto estos cambios pudieran tener efectos en la estructura tridimensional de la proteína o en su plegamiento, si bien estas especulaciones precisan de estudios más detallados como por ejemplo el análisis de modelado molecular o bien de estudios cristalográficos.

Los otros cambios corresponden a: una asparragina (N) por serina (S) que se encuentra localizado en el péptido señal por lo que no influye en la proteína madura; una treonina (T) por alanina (A); una alanina por treonina; y por último una leucina (L) por fenilalanina (F).

La caracterización teórica del punto isoelectrico y del peso molecular de las proteínas se realizó a través de programas informáticos a los que puede accederse en la dirección de internet <http://au.expasy.org/>. Las dos proteínas mostraron el mismo punto isoelectrico: 5,79; sin embargo el peso molecular no fue el mismo. La proteína deducida a partir del gen *cglcc1* mostró un peso de 56773,01 Da, mientras que la deducción teórica del peso molecular de la proteína correspondiente a la secuencia de nucleótidos del gen *cglcc1A* fue de 56465,66 Da. Quizás esta diferencia pudiera explicar los diferentes patrones de bandas encontrados en los zimogramas realizados en los días de cultivo en los que se producía decoloración del efluente.

3.6.3. Clonaje del ADNc del gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica* en el vector de expresión pYES2.

Para la realización del clonaje del ADNc del gen de lacasa de *C. gallica* se utilizó el vector de expresión pYES2 (cedido gentilmente por la Dra. María Fernández Lobato de la Universidad Autónoma de Madrid). Este vector de expresión, fue elegido porque posee un promotor pGAL inducible por galactosa y reprimible por glucosa, de manera que se pudieran mantener los cultivos en un modo de “expresión apagada”, disminuyendo así la selección de células mutantes que no estuvieran expresando la proteína, durante la fase de crecimiento celular, como resultado de la carga metabólica agregada en las células, que expresan altos niveles de la proteína foránea o del efecto tóxico de esta proteína en las células. Además posee un sitio de clonaje múltiple en el que se encuentra la zona de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam* HI, utilizada para el clonaje del ADNc de este gen, el origen de replicación de 2 μ de *Saccharomyces*, el gen de resistencia a ampicilina (que hace posible seleccionar los transformantes en bacterias) y el gen URA3 que se utiliza para la selección de transformantes en levaduras.

El clonaje del cDNA del gen de lacasa *cglcc1A* se realizó según se muestra en la figura 37. El vector pYES2 fue digerido con la enzima de restricción *Bam* HI y de esta manera linearizado. El ADNc del gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica* fue sintetizado, como se muestra en el apartado

3.6.1. de Resultados. Los cebadores utilizados para la síntesis del ADNc del gen de lacasa fueron diseñados de manera que el gen llevara en sus extremos sitios de reconocimiento para la enzima de

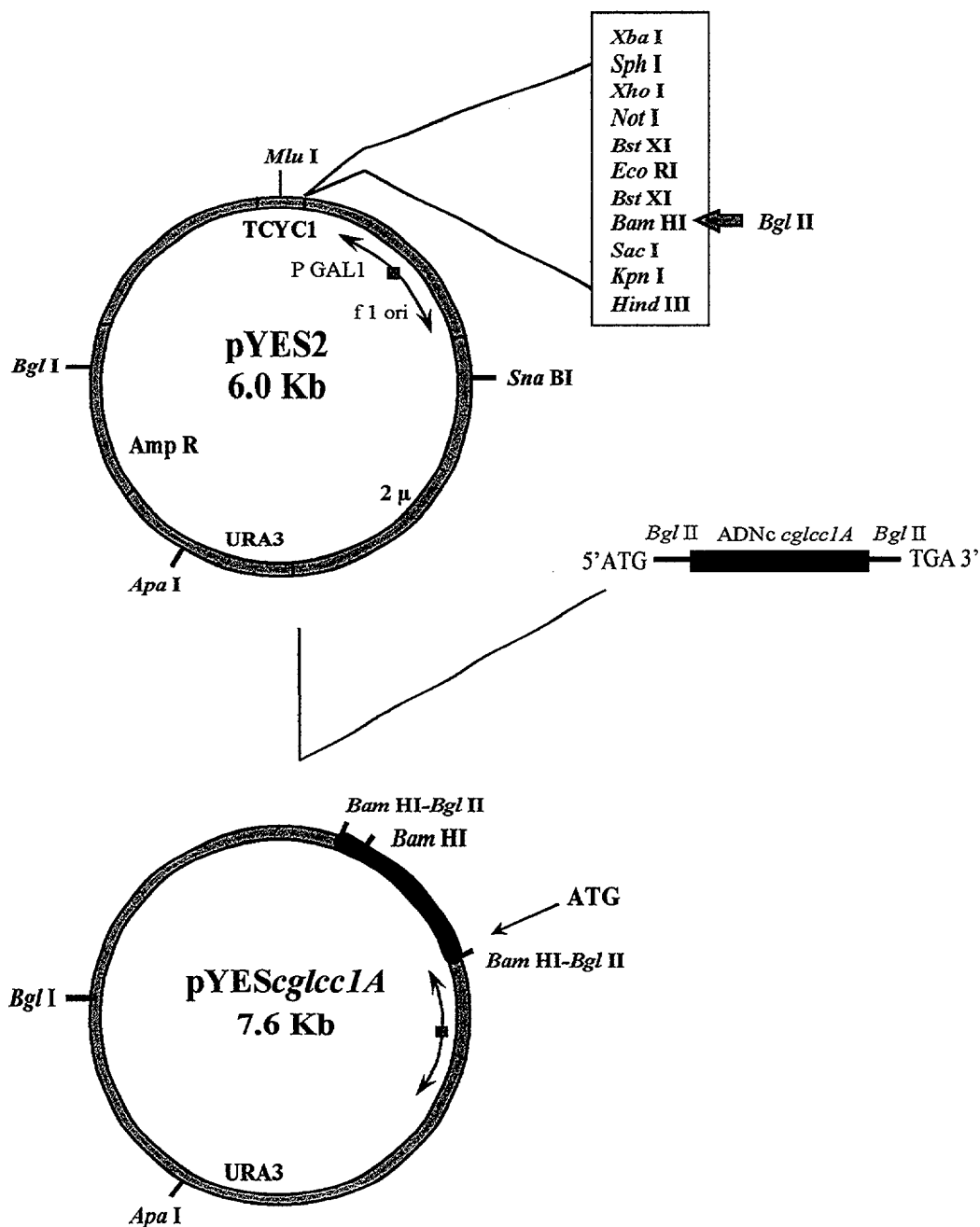


Figura 37: Representación esquemática del clonaje del ADNc del gen *cgIcc1A* de lacasa de *Coriopsis gallica* en el vector de expresión pYES2. Clonaje en Bam HI. ADNc con extremos Bgl II.

restricción Bgl II y que se mantuviera la secuencia del péptido señal de la proteína, así ésta podría ser reconocida y exportada, al medio extracelular, por la levadura. El ADNc fue amplificado por PCR y la banda correspondiente a este ADNc, se purificó a partir de un gel preparativo de agarosa 1%. Esta banda purificada fue digerida con la enzima de restricción Bgl II para cortar sus extremos.

Antes de ello, se comprobó que este ADNc no contenía, en su secuencia, ningún otro sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bgl* II, de manera que pudiera cortar el ADNc, generando fragmentos indeseados para el clonaje de la secuencia codificante del gen entero. Ambas enzimas de restricción, *Bam* HI y *Bgl* II, generan extremos que son compatibles, con lo que se procedió a la ligación del ADNc con el vector de expresión pYES2 mediante el tratamiento con la ligasa del fago T4.

3.6.4. Transformación en bacterias de la construcción pYES2*cglcc1A* y verificación del clonaje.

Para verificar la correcta dirección del clonaje del ADNc del gen de lacasa de *Corioloropsis gallica*, se procedió con la transformación de bacterias de la especie *Escherichia coli* cepa *DH5 α* con el producto de la ligación del ADNc del gen y el vector pYES2. A continuación, se realizó la selección de las bacterias recombinantes mediante su cultivo en placas con medios que contenían ampicilina. Una vez seleccionados y aislados los transformantes que eran resistentes a la ampicilina, fueron verificados mediante la extracción del vector de expresión y la realización del mapa de restricción del plásmido pYES*cglcc1A* para verificar el clonaje y su correcta orientación.

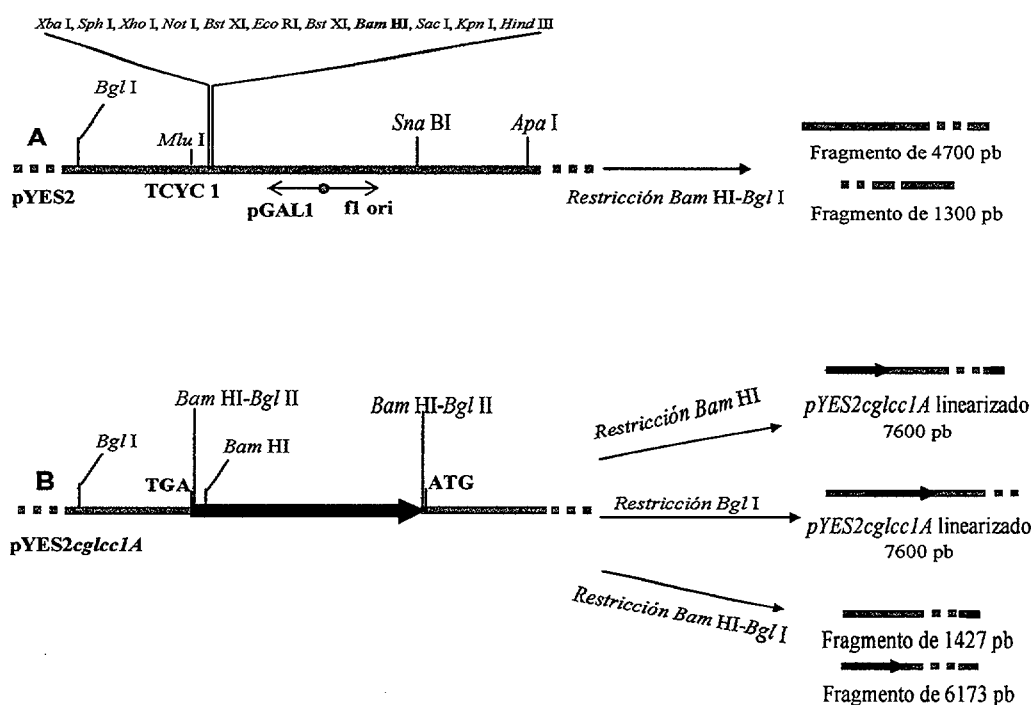


Figura 38: Representación esquemática de los fragmentos teóricos producidos por las digestiones con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Bgl* I y la doble digestión *Bam* HI-*Bgl* I, del vector pYES2 (A) y el pYES2*cglcc1A* (B).

En la figura 38 se representan los fragmentos que teóricamente deberían producirse al digerir tanto el vector pYES2 (A), como el pYES2*cglcc1A* (B) con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Bgl* I y una digestión doble de *Bam* HI-*Bgl* I.

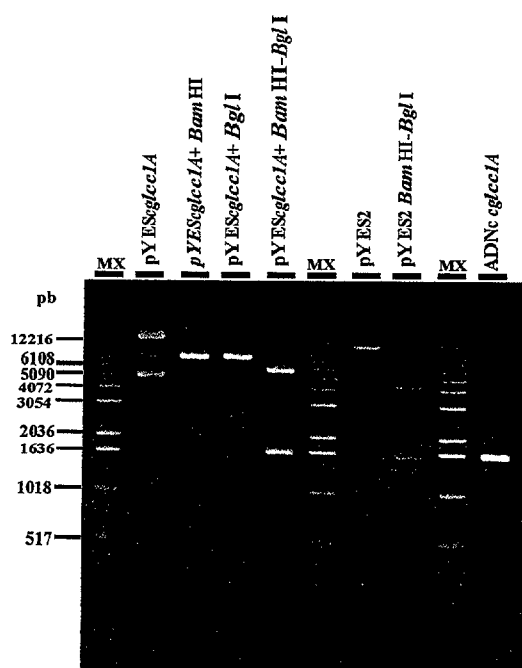


Figura 39: Electroforesis, en gel de agarosa al 1%, de los diferentes fragmentos generados en las distintas digestiones con enzimas de restricción del vector de expresión pYES2 y pYES2*cglcc1A*. MX: Marcador de peso molecular.

Los productos de estas digestiones se muestran en la figura 39. El primer carril del gel de agarosa corresponde a muestras del plásmido pYES2*cglcc1A* sin digerir con enzimas de restricción, con lo que aparecieron tres bandas correspondientes a sus tres formas de enrollamiento. Cuando digerimos este vector pYES2*cglcc1A*, tanto con la enzima de restricción *Bam* HI como con *Bgl* I (carriles 2 y 3 del gel) apareció una banda de 7600 pb que corresponde al tamaño del vector más el inserto cuando se lineariza. Al tratar este vector con ambas enzimas de restricción *Bam* HI y *Bgl* I, se obtienen dos bandas una de 1427 pb y otra de 6173 pb (carril 4 del gel de agarosa). El fragmento de 6173 pb procede del ADNc del gen *cglcc1A*, casi en su totalidad, (salvo 84 pb que son cortadas por la enzima de restricción *Bam* HI), y la gran mayoría del vector de expresión hasta el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción de *Bgl* I. El otro fragmento de 1427 pb abarcaría las secuencias desde el corte *Bgl* I del vector hasta incluir las 84 pb del ADNc, en donde se encuentra un sitio de reconocimiento *Bam* HI, dentro del gen.

En los carriles 5 y 6 aparecen, como controles, las muestras del vector pYES2 sin digerir (5), y tras su tratamiento con la doble digestión realizada con las enzimas *Bam* HI y *Bgl* I (6), en la cual aparecen dos bandas de tamaño 4700 y 1300 pb correspondientes a los sitios de corte para estas enzimas en el vector pYES2. Como un control, se puso en el último carril del gel de agarosa el ADNc del gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica*, sintetizado por PCR, que corresponde a una banda de 1553 pares de bases.

Con estos resultados, podemos verificar que el clonaje del ADNc del gen de lacasa ha sido realizado satisfactoriamente en pYES2 y en su orientación correcta, según el promotor pGAL del vector, pues de no ser así el patrón de bandas obtenido hubiera sido muy distinto, de dos bandas una de 2809 y otra de 4791 pares de bases, al hacer la doble restricción con *Bam* HI y *Bgl* I.

3.6.5. Transformación de la construcción pYES2*cglcc1A* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Como hospedador del vector de expresión que contenía el gen *cglcc1A* de lacasa de *Corioloopsis gallica* se utilizó la cepa W303-1b de *Saccharomyces cerevisiae* (cedida gentilmente por la Dra. Maria Fernández Lobato de la Universidad Autónoma de Madrid).

Esta cepa de *Saccharomyces* posee la característica de ser auxótrofa para los aminoácidos leucina, histidina, triptófano y las bases adenina y uracilo, de manera que esto nos permitió diferenciar a los transformantes, ya que el vector de expresión pYES2 contiene en su secuencia el gen URA3, por lo que aquellas levaduras que hubieran incorporado el vector y lo procesaran correctamente, habrían perdido la auxotrofia para el uracilo.

La transformación de la levadura se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.10.8.2. de Materiales y Métodos. La selección de las levaduras transformadas se realizó mediante su crecimiento en medios mínimos URA⁻ (apartado 2.3.2.2. de Materiales y Métodos), a los que se les añaden los aminoácidos para los cuales la cepa W303-1b es auxótrofa salvo el uracilo, que nos sirvió de marcador para la selección de los transformantes. Como control, para posteriores estudios, se hizo la transformación de levaduras con el vector de expresión pYES2, sin contener el ADNc del gen *cglcc1A*, de manera que lo pudiéramos utilizar como un control del comportamiento de la levadura transformada, pero sin el gen de lacasa.

De las levaduras transformadas se seleccionaron, en principio, 20 colonias que fueron aisladas y conservadas en medios mínimos, para mantener la presión selectiva de aquellas que habían incorporado el vector de expresión. Para verificar que contenían el vector se procedió a la extracción del mismo, de manera que se pudiera realizar la retrotransformación en la bacteria *Escherichia coli*. Una vez incorporado el vector en las bacterias se extraería y se analizaría mediante un mapa de restricción. Sin embargo, esto no se consiguió ya que las muestras obtenidas de las extracciones de los vectores de las levaduras, siempre contenían además del vector, grandes cantidades de ADN genómico y ARN de la levadura, lo que dificultaba la retrotransformación en bacterias.

Por ello, se decidió cambiar de estrategia y verificar la transformación de las levaduras mediante otro procedimiento que consistió en analizar si las levaduras transformadas estaban procesando correctamente el gen *cglcc1A* de lacasa de *Corioloopsis gallica* incorporado en el vector de expresión, mediante la técnica de RT-PCR tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.6.6. Análisis de expresión del gen *cglcc1A* en las levaduras transformadas.

Dado que el vector de expresión utilizado contiene el promotor pGAL, que es inducible por galactosa y reprimido por glucosa, se utilizaron medios que contenían galactosa como fuente de carbono. Así, se inocularon las levaduras transformadas en medios mínimos URA⁻ con galactosa, a los que se les añadió sulfato de cobre (a una concentración 0,1 mM) necesario para la actividad de la proteína lacasa.

Para este estudio se seleccionaron 5 colonias de levaduras transformadas que denominamos *Lt1*, *Lt10*, *Lt18*, *Lt19* y *Lt20*. La levadura transformada control, que contenía solamente el vector de expresión, sin el ADNc del gen *cglcc1A*, la denominamos *Ltc4*.

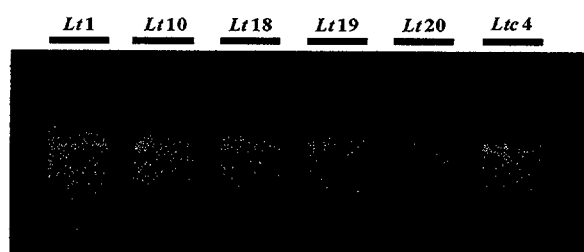


Figura 40: Electroforesis en gel de Agarosa 1% de los ARNs extraídos de las Levaduras transformadas. (*Lt*: levadura transformada; *Ltc*: levadura transformada control)

La extracción del ARN de las levaduras transformadas se realizó tal y como se describe en el apartado 2.10.1.2.2. de Materiales y Métodos. Las muestras de ARN fueron tratadas con la enzima ADNasa para asegurar que no tuvieran ADN genómico o plasmídico.

En la figura 40 se muestran los ARN extraídos de las levaduras transformadas tanto con el vector de expresión pYES2*cglcc1A*, como con pYES2 sin inserto (control *Ltc4*). Estos ARN se utilizaron como moldes para sintetizar, por la reacción de RT, la primera cadena del ADNc. Con la reacción de PCR, utilizando como molde las muestras de ADNc de las reacciones de RT, se sintetizó la segunda cadena y se amplificaron los productos generados en esta reacción. Como cebadores se usaron los denominados Nci y 3RT, que amplifican un fragmento de aproximadamente 690 pb del ADNc del gen *cglcc1A* de *Corioliopsis gallica*.

La secuencia de estos cebadores es la siguiente:

Cebador corriente arriba Nci: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCGCGATTGGCCCCAAGACTG-3'

Cebador corriente abajo 3RT: 5'-CAGTGGCTGCGTGTTACAC-3'

Las condiciones de esta reacción de PCR fueron de 55°C de temperatura de anillamiento de los cebadores y 30 ciclos de amplificación.

En la figura 41 se muestra el gel de electroforesis de los fragmentos generados por la reacción de RT-PCR de las muestras de ARN extraídas de las levaduras transformadas. Como se esperaba, se amplificó una banda de aproximadamente 690 pb en todos los casos, salvo en la muestra *Ltc4*, que era el control que contenía el vector de expresión pYES2 sin el ADNc del gen de lacasa.

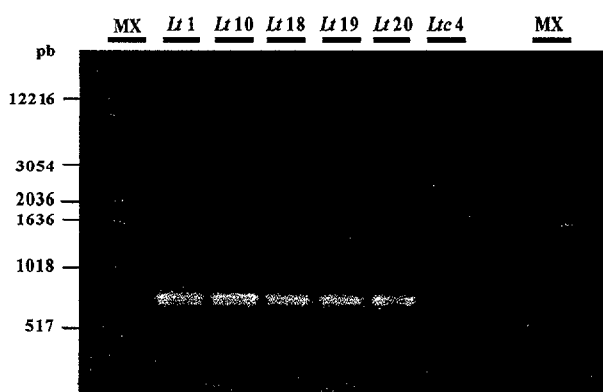


Figura 41: Electroforesis en gel de Agarosa 1% del fragmento generado en la reacción de RT-PCR de las muestras de ARN de las levaduras transformadas. **MX:** Marcador de peso molecular.

del vector de expresión, que se hubiera amplificado, aunque, como se ha dicho anteriormente, las muestras de ARN de las levaduras transformadas fueron tratadas con ADNasa.

Para esta verificación se procedió a repetir todo el ensayo, con la variación de que las levaduras fueron cultivadas en medios mínimos con glucosa como fuente de carbono. En estos medios, las levaduras transformadas poseen el promotor pGAL reprimido por la glucosa, con lo que no debe de haber expresión del gen. Se extrajeron los ARN de las muestras y se realizaron las reacciones de RT-PCR de igual manera y utilizando los mismos cebadores. Se utilizó, como control positivo de la extracción de ARN y de la reacción de RT-PCR, una muestra de la levadura transformada *Ltc1*, pero crecida en medio con galactosa.

En la figura 42 se muestra el resultado de este ensayo. En el primer carril del gel aparece el fragmento de 690 pb, amplificado por PCR, de la muestra de la levadura *Ltc1* crecida con galactosa. El segundo carril corresponde a la amplificación de un fragmento del control interno del kit, utilizado para la realización de la RT-PCR. En los carriles 3, 4 y 5 no se observaron bandas lo que muestra que no se produjo amplificación de ningún fragmento del gen, en aquellas muestras de levaduras transformadas (*Lt18*, *Lt19* y *Ltc4*) cuando estas fueron crecidas en medios mínimos con glucosa.

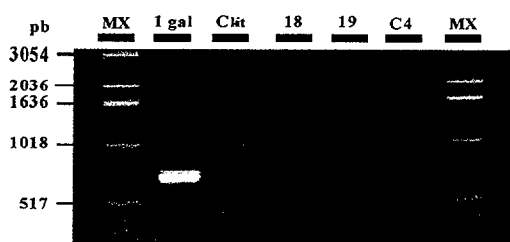


Figura 42: Electroforesis en gel de Agarosa 1% de los fragmentos obtenidos en la reacción de RT-PCR, de las muestras de ARN de las levaduras transformadas crecidas en medios con glucosa. **MX:** Marcador de peso molecular. gal:galactosa. Ckit control interno del kit de RT-PCR.

Estos resultados, ahora sí permiten confirmar que las bandas conseguidas anteriormente fueron debidas a la expresión del gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica* por las levaduras transformadas.

3.6.7. Estudios de la actividad lacasa producida por las levaduras transformadas.

3.6.7.1. Detección de la actividad lacasa en medios sólidos.

Una vez obtenidas las cepas de levaduras transformadas con el gen de lacasa de *Coriopsis gallica* y demostrada su capacidad para expresar la proteína, se procedió a detectar esta actividad lacasa en medios sólidos.

La actividad lacasa extracelular “*in vivo*” o como isoenzimas purificadas es determinada principalmente por ensayos fotométricos usando sustratos fenólicos y monitoreando el producto de oxidación coloreado. Los ensayos más usados son los que utilizan como sustratos los siguientes compuestos: guaiacol (Evans, 1985), 2,6-dimetoxifenol (Prillinger y Esser, 1975), siringaldazina (Harkin y Obst, 1973) o el sustrato no fenólico 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Childs y Bardsley, 1975).

Kojima y colaboradores (1990) detectaron la actividad lacasa, del gen de *Coriolus hirsutus* expresado en *Saccharomyces cerevisiae*, en ensayos en placa con agar conteniendo guaiacol como sustrato de la enzima. Cassland y Jönsson (1999) realizaron los mismos ensayos para detectar la actividad de un gen que codificaba para una lacasa de *Trametes versicolor*, expresado en *Saccharomyces cerevisiae* pero utilizando como sustrato ABTS,

Para detectar la actividad lacasa producida de forma heteróloga por *Saccharomyces cerevisiae* en placa se utilizaron medios mínimos URA⁻ con galactosa ó bien glucosa como fuentes de carbono, a las que se adicionó los sustratos ABTS (10 mM) ó 2,6-dimetoxifenol (10 mM). El sustrato guaiacol también fue utilizado en nuestros estudios, sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados.

La lacasa posee cuatro átomos de cobre en su centro activo, por ello, fue necesario suplementar el medio de cultivo con CuSO₄ para que éste llevara la cantidad de cobre necesaria para la correcta conformación de la proteína (Kojima y col., 1990; Cassland y Jönsson, 1999).

En la figura 43 se muestran los resultados obtenidos con el crecimiento de las levaduras, transformadas con el gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica*, en placas que contenían medios mínimos suplementados con el sustrato ABTS (10 mM) y CuSO₄ (0,1 mM). Transcurridos 10 días de incubación, a una temperatura de 30 °C, se pudo observar como en las placas que contenían galactosa, como fuente de carbono, aparecía un color verde alrededor de las colonias de levaduras transformadas (1, 10, 18 y 20) que indicó la secreción de la enzima lacasa al medio de cultivo y como consecuencia de ello la oxidación del sustrato ABTS (Fig. 43 A). En la zona donde se inoculó la levadura transformante control C4 no apareció esta coloración.

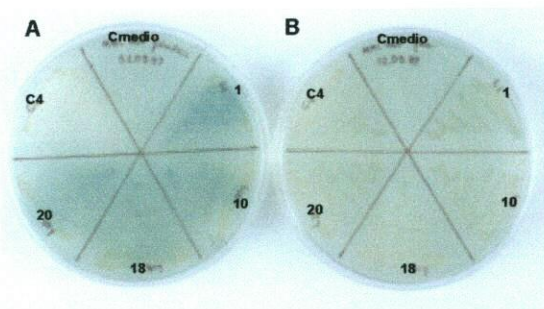


Figura 43: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA^- , con galactosa (A) y glucosa (B), ABTS 10 mM y $CuSO_4$ 0,1 mM. Tiempo de incubación: 10 días.

En las placas se reservó un sector de la misma que no fue inoculado, y que correspondía al control abiótico (Cmedio), de manera que pudiéramos verificar que éste no cambiaba de color con el tiempo de incubación. En la figura 43 A se puede apreciar como en la zona donde creció la levadura control C4 no se produjo coloración verde, sin embargo el medio perdió coloración, volviéndose más blanquecino, con respecto al color que presentaba el control del medio. En la placa que contenía glucosa, como fuente de carbono, no apareció coloración verde en ninguna de las levaduras transformadas (Fig. 43B). Este resultado era de esperar ya que este azúcar mantiene reprimido al promotor pGAL bajo el cual está regulada la producción de proteína.

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos en la detección visual de la actividad lacasa cuando se utilizó el sustrato 2,6-dimetoxifenol. Al igual que en las placas con ABTS, la actividad de la proteína heteróloga produjo un producto de oxidación de color anaranjado que pudo verse en la placa que contenía galactosa (Fig. 44A) y sólo en aquellos sectores de la placa donde crecieron las levaduras transformadas (1, 10, 18 y 20). En la zona donde creció la levadura control C4 no se observó este color anaranjado, sin embargo se vio un cambio del color en el medio de cultivo, producido por el crecimiento de la levadura control, que hacía que el medio presentara un color más claro.

La placa que contenía medio mínimo con glucosa (Fig. 44B), no mostró ese color anaranjado, producto de la oxidación del sustrato, en ninguno de los sectores inoculados con las levaduras transformadas, debido a la represión del promotor por la glucosa del medio de cultivo.

Estos resultados permiten concluir que las levaduras transformadas fueron capaces de procesar, de forma correcta, el gen *cglcc1A* de *Corioliopsis gallica*, en aquellos medios en los que se indujo su expresión.

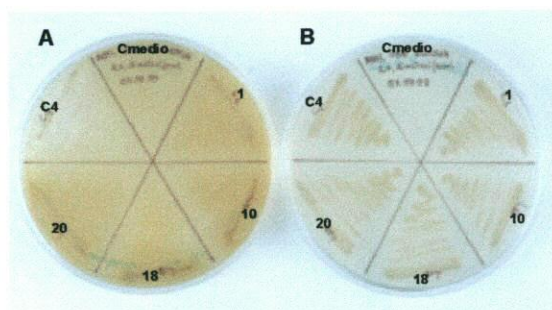


Figura 44: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA^- , con galactosa (A) y glucosa (B), 2,6-dimetoxifenol 10 mM y $CuSO_4$ 0,1 mM. Tiempo de incubación: 10 días.

3.6.7.2. Optimización de las condiciones de producción de la actividad lacasa.

Una vez comprobado que la proteína heteróloga era producida de forma activa por la levadura se hicieron modificaciones en los medios de cultivo empleados, con objeto de optimizar las condiciones de producción y actividad de la misma. En este estudio se utilizó, en todos los casos, el sustrato ABTS para la detección de la actividad de la enzima lacasa.

Modificaciones en la fuente de carbono del medio de cultivo.

La ventaja de construir un sistema de expresión con un promotor inducible por galactosa fue que se pudo manejar la expresión de la producción de la proteína heteróloga. Sin embargo, presentó el inconveniente de que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b no creció bien en los medios que contenían galactosa como fuente de carbono. Se pensó, entonces, en añadir otra fuente de carbono, de manera complementaria, al medio de cultivo que favoreciera el crecimiento de las levaduras transformadas. Se eligió la manosa, ya que se ha descrito que su presencia en los medios de cultivo, facilita la secreción de las proteínas (Goto y col., 1999), con lo cual al añadir manosa a nuestros medios en teoría conseguiríamos por un lado favorecer el crecimiento de las levaduras transformadas y por otro facilitar la secreción al medio extracelular de la proteína producida de forma heteróloga.

Se comprobaron, entonces, las concentraciones en el medio de cultivo de uno y otro azúcar para las cuales la galactosa siguiera induciendo al promotor y la manosa facilitara el crecimiento y la secreción. Las cantidades ensayadas de uno y otro azúcar fueron: 25% galactosa con 75% de manosa simultáneamente, 50% de ambos azúcares y 75% de galactosa con 25% de manosa,

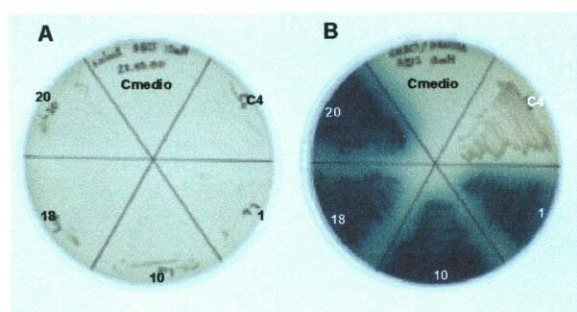


Figura 45: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placas con medio mínimo URA^- , con galactosa en **A** y galactosa/manosa (75%/25%) en **B**, ABTS 10 mM, $CuSO_4$ 0,1 mM. 5 días de incubación.

conjuntamente. En este último caso se comprobó que la levadura podía crecer mucho mejor y detectarse una actividad de la proteína considerablemente superior a los casos donde se utilizaba sólo la galactosa como única fuente de carbono.

En la figura 45 se aprecian las diferencias en el crecimiento de las levaduras transformadas (1, 10, 18 y 20) en el medio con galactosa control (Fig. 45A) y el medio con galactosa (75%) y manosa (25%) (Fig. 45B) conjuntamente. Todas las placas contenían 10 mM de ABTS como sustrato de la enzima y $CuSO_4$ a una concentración final de 0,1 mM.

Las levaduras transformadas crecieron mucho mejor en el medio que contenía manosa y galactosa. La actividad lacasa se detectó visualmente mucho antes en estos medios, ya que a los cinco días de incubación mostraban ya un color verde intenso que no fue observado hasta los 10 días de incubación en las levaduras transformadas que crecieron en el medio control con galactosa.

Con esta modificación del medio de cultivo se consiguió, por un lado, mejorar el crecimiento de las levaduras transformadas, pero también se facilitó la detección visual de la actividad lacasa, que pudo deberse a la mayor cantidad de biomasa y/o a la mejor secreción de esta proteína.

Modificaciones en la concentración del sustrato (ABTS).

El compuesto ABTS ha sido muy utilizado como sustrato en la detección de actividad lacasa de proteínas producidas de forma heteróloga en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Cassland y Jönsson, 1999) y *Pichia pastoris* (Jönsson y col, 1997; Gelo-Pujic y col, 1999; Otterbein y col., 2000). Estos autores en sus ensayos detectaron la actividad lacasa en medios sólidos utilizando el sustrato ABTS a una concentración final de 0,2 mM. Hasta ahora, nuestros ensayos se habían realizado a una concentración final de 10 mM de ABTS, con lo que se decidió realizar un estudio de la actividad lacasa en las levaduras transformadas con esta nueva concentración del sustrato (0,2 mM), con el fin de comparar si se obtendría, de esta manera, una mejor detección visual de la actividad.

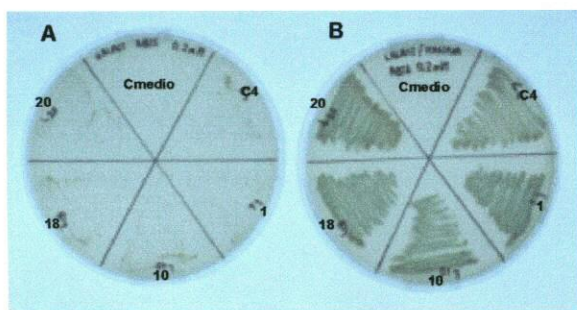


Figura 46: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placas con medio mínimo URA⁻, con galactosa en **A** y galactosa/manosa (75%/25%) en **B**, ABTS 0,2 mM, CuSO₄ 0,1 mM. 5 días de incubación.

En la figura 46 se muestran los resultados obtenidos cuando las levaduras fueron crecidas en medios mínimos con una concentración final de ABTS de 0,2 mM. En nuestro caso la detección visual de la actividad lacasa resultó mejor cuando la concentración del sustrato fue de 10 mM (Fig. 45), donde a los 5 días de incubación ya se apreciaba un intenso color verde en las levaduras

transformadas (1, 10, 18 y 20). Sin embargo, en estos medios con 0,2 mM de ABTS no se observó cambio, de color del sustrato hasta los 10 días de incubación de las levaduras transformadas.

En estos ensayos se volvió a observar un mayor crecimiento de las levaduras transformadas en los placas que contenían galactosa y manosa conjuntamente (75% y 25%, respectivamente) (Fig. 46B), con respecto al crecimiento de las levaduras en el medio que contenía galactosa sólo como fuente de carbono (Fig. 46A).

A la vista de los resultados obtenidos en este ensayo, decidimos proseguir nuestros estudios utilizando el sustrato ABTS a una concentración final de 10 mM en el medio de cultivo.

Modificaciones en la concentración de CuSO_4 .

La enzima lacasa, producida por hongos basidiomicetos, es una enzima de tipo fenoloxidasa que posee varios átomos de cobre en su estructura. Para la correcta conformación de la proteína producida de forma heteróloga, es necesario que el medio de cultivo, de las levaduras transformadas, esté suplementado con cantidades suficientes de cobre. Sin embargo, los medios mínimos utilizados para el desarrollo de estas levaduras transformadas no contienen cobre en su composición.

Estudios en placa realizados por diferentes autores para detectar la actividad enzimática de la lacasa de *Trametes versicolor* expresada en *Saccharomyces cerevisiae* (Cassland y Jönsson, 1999) y *Pichia pastoris* (Gelo-Pujic y col., 1999), utilizaron como fuente de cobre el sulfato de cobre, a una concentración final de 0,1 mM con la que suplementaban el medio de cultivo de las levaduras transformadas.

Hasta ahora, en nuestros estudios hemos estado utilizando esta misma fuente de cobre y a la misma concentración 0,1 mM. Sin embargo, decidimos probar diferentes concentraciones con el fin

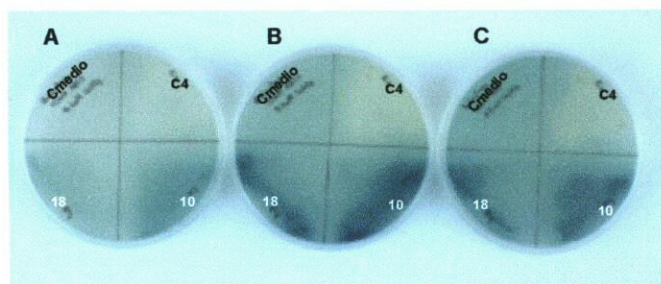


Figura 47: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA^- , con galactosa, ABTS 10 mM y diferentes concentraciones de CuSO_4 (A: 0,1 mM; B: 0,4 mM; C: 0,8 mM). 8 días de incubación.

de comprobar si afectaba a la actividad de la enzima. Las distintas concentraciones de CuSO_4 ensayadas fueron de 0,1, 0,4 y 0,8 mM. También se ensayó una fuente distinta de cobre, como es el CuCl_2 , obteniéndose el mismo resultado que con el sulfato de cobre, con lo que estos resultados no se muestran.

En la figura 47 se aprecian las diferencias observadas en la actividad lacasa de las levaduras transformadas (10 y 18), tras 8 días de incubación en medios mínimos con ABTS (10 mM), galactosa como fuente de carbono, y distintas concentraciones de CuSO_4 .

El cambio de color del ABTS, debido a la oxidación del sustrato por la enzima lacasa, fue algo más intenso en aquellos medios que contenían concentraciones más elevadas de cobre (0,4 y 0,8 mM), en comparación con la actividad detectada en los medios con 0,1 mM de CuSO_4 . Apenas se observaron diferencias en la actividad entre los medios con 0,4 y 0,8 mM de CuSO_4 . En estos

medios también se observó una aclaración del medio de cultivo en el sector de la placa en el que se había inoculado la levadura transformada control C4, con respecto al color del control del medio (C medio).

Este mismo ensayo se repitió variando la fuente de carbono del medio de cultivo, suplementándola con manosa, como se había hecho anteriormente. El porcentaje de galactosa y manosa fue de 75% y 25%, respectivamente.

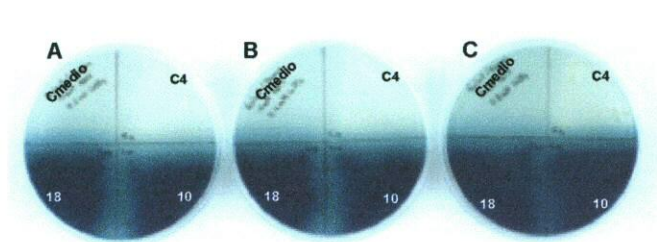


Figura 48: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectadas en placas con medio mínimo URA^- , con galactosa y manosa (75%/25%), ABTS 10 mM y diferentes concentraciones de $CuSO_4$ (A: 0,1 mM; B: 0,4 mM; C: 0,8 mM). 5 días de incubación.

La figura 48 muestra los resultados obtenidos tras cinco días de incubación, en medios conteniendo galactosa y manosa, 10 mM de ABTS y diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Al igual que se observaba en los ensayos anteriores, la actividad lacasa detectada visualmente en las levaduras transformadas (10 y 18)

fue mucho más intensa en estos medios con galactosa y manosa, que en aquellos medios que contenían solamente galactosa, como fuente de carbono. Sin embargo, a diferencia de los estudios anteriores con galactosa, no se obtuvieron diferencias en la intensidad del color del sustrato oxidado con respecto a las diferentes concentraciones de sulfato de cobre, o por lo menos no se pudieron apreciar esas diferencias por la gran intensidad del color verde producida por la actividad lacasa de las levaduras transformadas.

Como resumen de los estudios realizados para optimizar la detección visual de la actividad lacasa del gen *cglcc1A* de *Coriopsis gallica*, expresado de manera heteróloga en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, podemos concluir que los mejores resultados de actividad lacasa detectada visualmente, de las levaduras transformadas, se obtuvieron cuando estas fueron crecidas en medio mínimo URA^- , con el sustrato ABTS a una concentración final en el medio de 10 mM, y con una concentración de $CuSO_4$ de 0,4 mM y utilizando galactosa y manosa conjuntamente como fuentes de carbono en porcentaje 75% y 25%, respectivamente.

En la figura 49 se muestra la actividad lacasa detectada

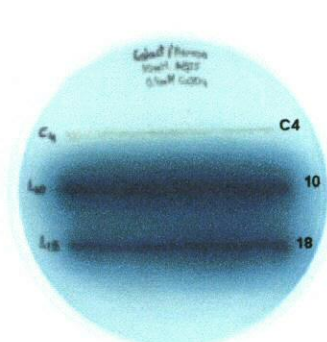


Figura 49: Actividad lacasa de las levaduras transformadas detectada en placa con medio mínimo URA^- , con galactosa (75%) y manosa (25%), ABTS 10 mM y $CuSO_4$ 0,4 mM. 5 días de incubación.

en las levaduras transformadas (10 y 18) en las condiciones (de entre las ensayadas) de mejor crecimiento, secreción y detección del producto de oxidación del sustrato ABTS por la actividad de la enzima. Así mismo, se muestra la levadura transformada control (C4), en donde no se produjo ninguna coloración.

3.6.7.3. Estudios de la actividad enzimática de la proteína heteróloga en cultivos líquidos.

Una vez comprobado que las levaduras transformadas con el gen *cglcc1A* de *Corioloropsis gallica* eran capaces de expresar y producir activamente la proteína heteróloga, en medios sólidos, se realizó un estudio de la producción de esta lacasa recombinante, en medios líquidos. Para ello, se inocularon matraces de 250 ml con 100 ml de medio mínimo URA⁻, con galactosa como fuente de carbono y CuSO₄ (0,4 mM), con las levaduras transformadas L10 y L18 y la levadura control C4 y se incubaron en agitación (300 rpm) a 30 °C. En los días siguientes a la inoculación se fueron haciendo medidas espectrofotométricas tanto del crecimiento celular (a una longitud de onda 600 nm), como de la actividad lacasa utilizando el sustrato ABTS. En este último caso, las muestras fueron, previamente centrifugadas durante 15 minutos a 10000 rpm, con el objeto de eliminar las células de levadura que pudieran interferir en la medición de la actividad lacasa. En estos ensayos no se detectó actividad lacasa en ninguna de las muestras analizadas.

Uno de los problemas planteados en la detección de la actividad lacasa en las levaduras transformadas es la posible acción de las proteasas, presentes en el medio de cultivo, y liberadas por las levaduras, que pueden degradar la proteína expresada de manera heteróloga (Jönsson y col., 1997; Glover y col., 1997; Flores y col., 1999; Otterbein y col., 2000). De acuerdo con esto, se repitieron estos ensayos utilizando los mismos medios de cultivo, pero se les añadió un preparado de inhibidores de proteasas (Roche) para evitar la acción de las mismas sobre la proteína lacasa. Por su parte, Jönsson y colaboradores (1997), comprobaron que era muy importante el uso de un medio de cultivo tamponado a pH 6,0 para poder obtener actividad lacasa en los cultivos líquidos de *Pichia pastoris*, transformada con el gen que codifica para una lacasa de *Trametes versicolor*. Una de las posibles explicaciones es que a pH's más ácidos pueden actuar proteasas ácidas destruyendo la proteína recombinante. Por ello se ajustó el pH de los medios de cultivo de las levaduras transformadas utilizando buffer fosfato pH 6,0. En estos ensayos tampoco se detectó actividad lacasa recombinante en ninguna de las muestras.

Otro de los estudios realizados, en medio líquido, fue el de incubar los cultivos de las levaduras transformantes a distintas temperaturas (21 °C y 30 °C) ya que se ha comprobado que la producción de enzima activa producida por la expresión heteróloga del gen de lacasa de *Trametes versicolor* en *Saccharomyces cerevisiae*, fue dependiente de la temperatura del cultivo (Cassland y Jönsson,

1999). En nuestros estudios no se detectó actividad lacasa espectrofotométricamente a ninguna de las temperaturas ensayadas.

En todos los casos ensayados, al hacer la medición espectrofotométrica de la actividad lacasa con el sustrato ABTS, se producía una reacción de reducción del ABTS que alteraba la correcta cuantificación de la actividad enzimática, produciéndose una disminución de la absorbancia de forma gradual, dando valores “negativos” de actividad lacasa. Este mismo efecto de reducción del sustrato ABTS se había observado en los cultivos, en medio sólido, de las levaduras transformadas donde se observaba que el medio de cultivo se hacía más claro, incluso blanquecino, en los sectores de la placa donde se inoculaban las levaduras control (C4).

Se realizó un ensayo en el que se crecieron las levaduras transformadas en medio mínimo, con galactosa y sulfato de cobre, y se incubaron durante 7 días a 30 °C. Transcurrido este tiempo, de incubación, se centrifugaron los cultivos durante 15 minutos a 10000 rpm y se filtraron mediante filtros Millipore de 0,22 μ , para eliminar cualquier resto celular. Al caldo enzimático, obtenido de

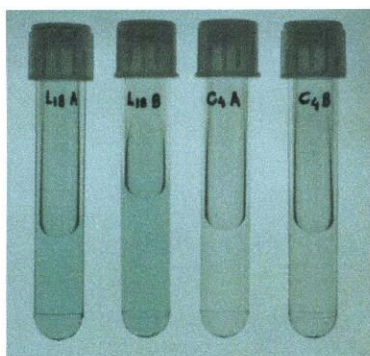


Figura 50: Ensayo de actividad lacasa de las levaduras transformadas con el gen de lacasa de *C. gallica* (L18 A y B) en mezclas con caldo enzimático y ABTS (10 mM). C4 A y B: levaduras transformadas control.

esta manera, se le añadió una solución de ABTS (a concentración final de 10 mM). Esta mezcla se incubó a 30 °C, en agitación (300 rpm), durante 24 horas, en oscuridad. Al cabo de este tiempo los caldos, procedentes de las levaduras transformadas con el gen de lacasa de *C. gallica* (L18 A y B) mostraron el color verde característico de la oxidación del sustrato ABTS, mientras que los que pertenecían a las levaduras transformadas control, sin el gen de lacasa, (C4 A y B), no presentaban este color (Fig. 50). Estos resultados mostraron que en estos cultivos las levaduras transformadas están expresando y secretando de forma

activa la enzima lacasa y que ésta fue capaz de actuar con el sustrato ABTS.

Se decidió, entonces, medir la actividad lacasa de los cultivos de levaduras transformadas con otro sustrato de la lacasa diferente, como es el 2,6-dimetoxifenol. Con este sustrato se consiguió eliminar el efecto de interferencia observado con el ABTS y por tanto de los valores negativos de actividad. Sin embargo, los valores de actividad que se obtuvieron fueron positivos, tanto en las muestras de cultivo de las levaduras transformadas como en las de las levaduras controles (levadura C4).

A partir de aquí se realizaron diferentes ensayos en los que se concentraron los caldos de cultivo de las levaduras transformadas para poder realizar las detecciones de la actividad lacasa. De

esta forma se tomó una muestra del caldo procedente de un cultivo de 10 días de la levadura transformada con el gen de lacasa de *C. gallica* (L18) crecida en medio mínimo con galactosa y sulfato de cobre y se concentró 90 veces. Se tomó una alícuota, de 500 μ l, de este concentrado y se midió en el espectrofotómetro con 500 μ l del sustrato ABTS. Se fue midiendo la actividad lacasa cada 5 minutos. Se observó que durante los primeros 15 minutos esta actividad resultaba negativa, dando valores de absorbancia menores que cero, sin embargo a los 20 minutos la absorbancia empezó a aumentar y a dar valores positivos llegando a un máximo de 0,8 mUA/ml de actividad a los 35 minutos de lectura. A partir de aquí los valores volvieron a disminuir quizás debido a un agotamiento del sustrato ABTS o a una posible pérdida de la actividad de la enzima. Estos resultados muestran la existencia de una actividad enzimática lacasa en los medios de cultivo de las levaduras transformadas, si bien la medida de esta actividad usando ABTS, estaría subestimada.

Se realizó una cinética en medios mínimos con galactosa y sulfato de cobre utilizando las levaduras transformadas L10 y la levadura transformada control C4. Se tomaron muestras de estos cultivos a las 15 y 36 horas de incubación, evitando así el envejecimiento de los cultivos y las pérdidas de actividad lacasa debido a las proteasas producidas por la lisis celular. Las muestras obtenidas de estos caldos de cultivo se concentraron 10 veces. A continuación se analizó la actividad lacasa utilizando ABTS, 2,6-dimetoxifenol y siringaldazina, con un tiempo de lectura en el espectrofotómetro de 15 minutos. Cuando se midió con el sustrato ABTS el resultado fue como en los casos anteriores detectándose valores negativos de absorbancia. Con el sustrato 2,6-dimetoxifenol los valores fueron de nuevo positivos en ambos casos, levaduras transformadas y controles. Sin embargo al medir estas muestras con el sustrato siringaldazina, no se producía ninguna interferencia en la medición observándose valores positivos de actividad lacasa en las levaduras transformadas con el gen de lacasa de *C. gallica* (L10) de 0,055 mUA/ml y 0,107 mUA/ml en las horas 15 y 36 de incubación, respectivamente en tanto que los valores de absorbancia de la levadura control se mantuvieron en cero. Estos resultados mostraron que la siringaldazina representa un buen sustrato para futuros ensayos de actividad lacasa de este sistema de expresión heteróloga.

Los valores de actividad lacasa detectados en los medios de cultivo de las levaduras transformadas resultan similares a los observados en los cultivos de *Coriopsis gallica*, en los primeros días de incubación. La actividad lacasa de *C. gallica* en medio Kirk líquido no se detecta hasta el día 3 de incubación y tiene valores aproximados de 0,1 mUA/ml, mientras que en las levaduras transformadas a las 36 horas de incubación ya se habían alcanzado estos valores de actividad lacasa (0,107 mUA/ml). Estos resultados nos llevan a seguir realizando estudios para optimizar las condiciones de producción de lacasa recombinante en las levaduras transformadas.

El presente trabajo comprende tres etapas fundamentales. En la primera se realizó el análisis de la capacidad del hongo basidiomiceto *Coriolopsis gallica* para crecer y degradar un efluente procedente de la industria cervecera, con el objetivo final de aplicar este hongo *in vitro* en el tratamiento de este tipo de residuos, o de otros que muestren características similares. Se optimizaron las condiciones de cultivo para favorecer la degradación, y en una segunda etapa, se realizó un estudio de los mecanismos involucrados en el proceso, con especial énfasis en la maquinaria enzimática involucrada en el mismo, y en concreto en el aspecto molecular de la producción de lacasas. La tercera etapa del trabajo consistió en la puesta a punto de un sistema para la expresión heteróloga de un gen de lacasa de *C. gallica* considerándolo con vistas a una posible aplicación biotecnológica.

Si bien a lo largo del trabajo se han ido discutiendo brevemente los resultados, en este apartado se pretende analizarlos y discutirlos en su conjunto y confrontarlos con los obtenidos por otros investigadores.

4.1. Potencial de *Coriolopsis gallica* para la degradación del efluente de la industria cervecera.

Las pruebas en placas Petri con medios de cultivo sólidos suplementados con sustratos naturales o sintéticos, son ensayos simples, rápidos y de gran utilidad para valorar, de manera cualitativa, la capacidad de los microorganismos para crecer y degradar una amplia gama de compuestos. Por esta razón se decidió emplear este tipo de ensayos para iniciar el estudio de la posible utilización de *C. gallica* en el tratamiento de un efluente derivado de la producción de cerveza.

Puesto que la hipótesis de partida fue que la degradación de este tipo de efluente por el hongo implicaría la participación de su sistema ligninolítico, sin descartar la contribución de otras enzimas al proceso, el estudio abordó en primer lugar la comparación de la capacidad de crecimiento y degradación del efluente por *C. gallica* con la de otras dos especies de basidiomicetos: una utilizada como modelo en los estudios de degradación de la lignina: *Phanerochaete chrysosporium* y otra empleada en estudios de degradación de efluentes industriales, en nuestro laboratorio: *Trametes* sp. I-62.

Phanerochaete chrysosporium es el organismo que ha sido tomado como modelo en la degradación de la lignina por su capacidad para degradarla eficientemente (Buswell y Odier, 1987;

Kirk y Farrell, 1987; Boominathan y Reddy, 1992; Gold y Alic, 1993; Reddy 1993; Cullen, 1997). De su sistema enzimático han sido estudiadas, ampliamente, dos de las principales enzimas ligninolíticas: la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa (Gold y Alic, 1993; Cullen, 1997). Es necesario destacar que los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca poseen una compleja maquinaria enzimática para llevar a cabo los procesos de degradación en la naturaleza (Leonowicz y col., 1999).

El hongo basidiomiceto de podredumbre blanca *Trametes* sp. I-62 se seleccionó en nuestro laboratorio por su gran capacidad para producir lacasas en diferentes medios de cultivo (Mansur 1996). Posteriormente los estudios a nivel molecular permitieron el clonaje de 4 genes de lacasa en este hongo sujetos a regulación diferencial de la expresión (Mansur y col., 1997; 1998; González y col., 2003a y b). Esta cepa posee una alta capacidad de degradación de sustratos complejos como alcaliligninas, colorantes poliméricos, ácidos húmicos y melanoidinas sintéticas y se ha demostrado su gran potencial en el tratamiento de efluentes derivados de la producción de alcohol a partir de melazas de caña de azúcar. En las condiciones de máxima degradación se han descrito altos niveles de actividad lacasa y no se ha detectado actividad de otro tipo de enzima ligninolítica (González y col., 2000; González, 2001).

En nuestro trabajo, *Phanerochaete chrysosporium* fue la cepa que tuvo el mayor crecimiento tanto en los medios control como en los que contenían 20% de efluente. En los medios sin efluente, creció mejor en el medio 7 que en el medio Kirk, sin embargo, cuando estos medios contenían efluente el resultado fue de un mejor crecimiento en el medio Kirk y la decoloración sólo se produjo en este último. Es bien conocido que la actividad ligninolítica de *Phanerochaete chrysosporium* se activa en medios limitados en nitrógeno, durante la fase del metabolismo secundario, (Keyser y col., 1978) por lo que nuestros resultados resultan lógicos si se tiene en cuenta que el contenido de nitrógeno del medio Kirk es mucho menor que el del medio 7. En cuanto a *Trametes* sp. I-62 su crecimiento fue muy parecido en los dos medios y la decoloración se produjo en ambos. Estudios realizados con esta cepa (Mansur y col., 1997; González, 2001) han demostrado que puede producir altos niveles de lacasas tanto en medio 7 como en medio Kirk y que esta actividad enzimática es mayor incluso cuando estos medios se suplementan con efluentes derivados de la producción de alcohol a partir de mieles de caña de azúcar.

A diferencia de los otros dos basidiomicetos, *C. gallica* creció mejor en los medios suplementados con efluente que en los controles, lo que puede indicar que la adición del efluente estimuló el crecimiento del hongo. Los basidiomicetos son organismos quimio-organotróficos y tienen la capacidad de utilizar varias fuentes orgánicas de carbono para su metabolismo (Fell y col., 2001). El mayor crecimiento de este hongo en los medios con efluente sugiere que los compuestos

orgánicos presentes en el mismo pueden ser utilizados por el hongo para su crecimiento y desarrollo.

C. gallica fue capaz de crecer tanto en medio 7 como en medio Kirk hasta una concentración final de efluente de 80%, si bien a concentraciones más altas de efluente se fue observando una influencia negativa sobre el crecimiento del hongo. Esto puede sugerir un posible efecto inhibitorio de algunos compuestos del efluente sobre el crecimiento de *C. gallica*. Se observaron, además, diferencias según el medio de cultivo empleado en el ensayo. En todas las concentraciones de efluente ensayadas el crecimiento de *C. gallica* fue menor en el medio 7 que en el medio Kirk. Es posible, que al igual que *Phanerochaete chrysosporium*, en este hongo se active el sistema ligninolítico en medios con bajo contenido en nitrógeno como es el medio de Kirk, de ahí los mejores resultados conseguidos en este medio. Calvo y colaboradores, en 1998, ya indicaron que la actividad lacasa en este basidiomiceto podría estar inducida por bajos niveles de nitrógeno y por la presencia de alcohol veratrílico en el medio de cultivo. En el medio Kirk con 80% de efluente pudo observarse el aumento del crecimiento del hongo cuando se añadió además alcohol veratrílico. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con *Trametes* sp. I-62 han sugerido que este compuesto puede utilizarse como fuente de carbono favoreciendo el crecimiento del hongo en los medios a los que es adicionado (Mansur y col., 1997; González, 2001).

Relacionado con la decoloración del efluente, en los medios con 20% del mismo se produjeron halos de decoloración en todos los medios desde los primeros días de incubación. Sin embargo a concentraciones más elevadas ésta sólo se produjo en el medio Kirk, y de forma más tardía según se aumentaba la cantidad de efluente en el medio de cultivo. En los medios con 60 y 80% de efluente pudo observarse una influencia del alcohol veratrílico sobre la decoloración. Esta fue mayor cuando este compuesto estaba presente, de hecho en los medios con 80% de efluente la decoloración sólo tuvo lugar cuando el medio Kirk se suplementó con alcohol veratrílico. El alcohol veratrílico es uno de los compuestos aromáticos cuyo papel respecto a la producción de las lacasas ha sido controvertido. Éste es un metabolito secundario que se sintetiza *de novo*, y es secretado por diferentes hongos de podredumbre blanca (Barbosa y col., 1996). Su capacidad de inducción varía según el organismo estudiado: se ha descrito el aumento de la actividad lacasa, atribuido a la presencia de este compuesto, en cultivos de basidiomicetos como *Trametes versicolor* (Sandhu y Arora, 1984), *Nematoloma frogardii* (Hofrichter y Fritsche, 1997), *Trametes* sp. I-62 (Mansur y col., 1997; González, 2001), en la cepa de hongo no clasificada i63-2 (Scheel y col., 2000) y en 10 especies de Trametoides estudiados en nuestro laboratorio (Arana-Cuenca y col., 2004). Sin embargo, otros autores no han encontrado inducción de la actividad lacasa al añadir este compuesto a cultivos de especies como *Lentinula edodes* (Zhao y Kwan, 1999) y *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y col., 2000). Estudios realizados por Calvo y colaboradores (1998) han

demostrado la influencia de este compuesto sobre la actividad lacasa en cultivos líquidos de *C. gallica*. En nuestros estudios, en medio sólido, no podemos hablar de una influencia del alcohol veratrílico sobre niveles de actividad lacasa. Lo que si se observa es un mayor crecimiento y decoloración en presencia de este compuesto, en altas concentraciones de efluente. El aumento del crecimiento se puede deber, en alguna medida, a la utilización del alcohol veratrílico como fuente de carbono alternativa, aunque no hay que descartar una posible inducción de la actividad lacasa que genere una detoxificación de los compuestos fenólicos presentes en el efluente y por tanto un mayor crecimiento y decoloración; ni la participación de otros mecanismos que conduzcan a disminuir la presencia de compuestos tóxicos en el medio de cultivo.

Para caracterizar cualitativamente el sistema ligninolítico de *C. gallica* con el fin de inferir su posible participación en el proceso de degradación del efluente se realizó un estudio con el uso de los colorantes de tipo antrona Poly R-478 y Azul de Ramazol. El análisis de la actividad ligninolítica de los microorganismos con colorantes poliméricos es relativamente reciente. En 1983, Glenn y Gold sugirieron por primera vez que los colorantes poliméricos podían aplicarse a la selección de cepas o especies con actividad ligninolítica particularmente fuerte. En nuestro estudio, el uso de estos colorantes, permitió constatar que *C. gallica* tiene una capacidad similar de crecimiento y decoloración del colorante Azul de Ramazol y del efluente de la industria cervecera. Sin embargo, su comportamiento frente al colorante Poly R-478 fue muy distinto. Se observó un crecimiento del hongo inferior, en presencia de este colorante, y una decoloración mucho más tardía del mismo. La decoloración del Poly R-478 ha sido relacionada fundamentalmente con la presencia de peroxidasas extracelulares (Gold y col., 1988); aunque se ha planteado también que puede ser causada por enzimas del tipo fenoloxidasas (Falcón y col., 1995; Barbosa y col., 1996). Hasta la fecha, en este hongo no se ha detectado actividad lignina peroxidasa y ni manganeso peroxidasa, pero si está totalmente demostrada la presencia de lacasas (Calvo, 1995; Calvo, 1998; Zapico 1999, Carbajo y col., 2002).

El Azul de Ramazol ha sido descrito como sustrato de fenoloxidasas (Bourbonnais y Paice, 1990; Zapico 1999) y de peroxidasas (Chahal y col., 1995). Algunos autores apoyan el criterio de que este compuesto podría tener mayor validez en la selección de microorganismos ligninolíticos que otros colorantes poliméricos como el Poly R-478, ya que la correlación entre la decoloración y la capacidad de degradación de la lignina es mayor con el Azul de Ramazol (Pasti y Crawford, 1991).

Zapico, en 1999, demostró que el Azul de Ramazol producía un efecto sobre la actividad lacasa de *C. gallica* semejante a la inducción producida por efluentes de la industria papelera, y sugirió que esta enzima era la responsable de la decoloración de este sustrato, pues el aumento de los niveles de transcritos del gen de lacasa *cglcc1* de lacasa de este hongo coincidió con el cambio de

coloración del Azul de Ramazol. Estos datos podrían explicar la decoloración temprana de este colorante, mientras que en medios con Poly R-478 tanto el crecimiento como la decoloración se produjeron más tardíamente y con menor intensidad.

En los diferentes estudios realizados en medios sólidos con 20% de efluente y con el colorante Azul de Ramazol, en medio Kirk con distintas fuentes de carbono, pudo observarse un mayor crecimiento de *C. gallica* en los medios con efluente, con respecto a los medios con el colorante. Esto respalda nuestra hipótesis de que el hongo puede estar utilizando los compuestos orgánicos presentes en el efluente para utilizarlos como fuente de carbono y energía en su desarrollo. Con respecto a las diferentes fuentes de carbono ensayadas el crecimiento fue muy similar en glucosa, fructosa y manosa, sin embargo, disminuyó bastante en los medios que contenían sorbosa, quizás debido a que posiblemente esta fuente de carbono sea poco metabolizable por *C. gallica*. Zapico, en 1999, realizó un estudio comparativo del consumo de glucosa y sorbosa por este mismo hongo, en cultivos líquidos, mediante cromatografía de gases y demostró que la sorbosa era muy poco metabolizada por el hongo. La sorbosa, en general, no puede ser utilizada como fuente de carbono por la mayoría de los microorganismos, sin embargo, pequeñas cantidades de este azúcar pueden ser metabolizadas (Moore, 1981).

La decoloración fue muy similar en los medios con efluente respecto a los medios con el colorante Azul de Ramazol. Un caso especial fueron aquellos medios que contenían sorbosa. En ellos, aun siendo el desarrollo del hongo bastante más lento, que en los otros medios, la decoloración comenzó el mismo día y al final del período de incubación se obtuvieron los mismos resultados de decoloración total de la placa de cultivo, que en el resto de los medios. Es decir, si relacionamos cantidad de biomasa con halos de decoloración producidos, en sorbosa se observaron los mejores resultados de decoloración. Diferentes estudios realizados con *C. gallica*, han mostrado que la decoloración de diferentes efluentes industriales está afectada por el tipo de fuente de carbono presente en los medios de cultivo (Calvo, 1995; Zapico, 1999). Además, se ha observado que la presencia de sorbosa influye sobre los niveles de actividad lacasa detectados, aumentando sus valores con respecto a los controles (Zapico, 1999). Estos resultados indican que puede existir una posible implicación de la lacasa en la degradación del efluente, lo que supondría para el hongo el poder obtener otras fuentes de carbono y energía para su desarrollo.

Todos estos estudios en medio sólido permitieron en gran medida optimizar las condiciones de cultivo para obtener un mayor crecimiento del hongo y una mejor decoloración del efluente. Sin embargo, estas pruebas tienen sus limitaciones al compararlas con las que se realizan en medios líquidos. En los cultivos en medios sólidos se afecta la transferencia de oxígeno, que sólo ocurre en la superficie del medio por lo que no se producen las condiciones óptimas para la acción de enzimas oxidativas, tales como la lacasa (Glenn y Gold, 1983). Por otra parte, existen problemas de

disponibilidad de nutrientes debido a que no todos los elementos del medio están completamente a disposición del microorganismo. En los medios líquidos con agitación, los procesos de decoloración son más eficientes que en los medios sólidos, debido a que la transferencia de oxígeno es más efectiva al aumentar la superficie de transferencia entre la biomasa y el medio (Swamy y Ramsay, 1999). La mayor eficiencia de la decoloración en los cultivos líquidos con agitación también se ha atribuido al estado fisiológico del hongo, es decir, en agitación el hongo tiende a formar agregados de micelio ("pellets") que facilitan la transferencia de oxígeno con el medio (Morgan y col., 1991). La biodegradación de colorantes y efluentes con basidiomicetos de podredumbre blanca ha sido atribuida a la actividad enzimática oxidativa extracelular que se ve incrementada si a los medios se les proporciona oxígeno (Field y col., 1993; Pahl y Baeurle, 1994). Los medios sólidos limitan la transferencia de oxígeno a través del medio y como consecuencia de esto, hay escasez de oxígeno lo que aparentemente inhibe la actividad de las enzimas oxidativas (Glenn y Gold, 1983). Algunos autores han utilizado espuma de poliuretano de diferente porosidad para resolver el problema de la transferencia de oxígeno en medios de cultivo líquido en estático para evaluar la influencia del oxígeno en la producción de enzimas extracelulares de hongos (Dosoretz y col., 1990, 1993; Rothschild y col., 1999).

Todo esto explicaría nuestros mejores resultados de decoloración en medios líquidos que en los sólidos. Así, en el medio 7 sólido, *C. gallica* sólo fue capaz de producir halos de decoloración a una concentración de 20% de efluente, mientras que cuando se realizó el tratamiento de este efluente en medios líquidos, se consiguieron buenos resultados de decoloración y disminución de la DQO en las tres concentraciones ensayadas (20, 40 y 60% de efluente). Además, el proceso de decoloración fue más tardío en estos medios sólidos, ya que la decoloración en medio 7 sólido con 20% de efluente comenzó a partir del cuarto día de incubación mientras que en cultivo líquido, en este mismo día ya se habían obtenido valores de casi el 40% de decoloración del efluente.

Hasta la fecha no existe ningún trabajo realizado sobre el tratamiento de este tipo de efluentes de la industria cervecera con hongos de podredumbre blanca, ni con sus enzimas ligninolíticas, a los que poder hacer referencia, pero sí existen numerosos estudios sobre el tratamiento de efluentes de otro tipo de industrias (Pointing, 2001), como los derivados de la industria de la molienda y extracción del aceite de oliva (OMW) (ver apartado: las lacasas y sus aplicaciones biotecnológicas de la Introducción) que poseen características parecidas a este tipo de efluentes, al ser ambos derivados de materias primas vegetales y con alto contenido de fenoles. Los efluentes OMW están formados fundamentalmente por agua (83-92%), materia orgánica (4-16%) y minerales (1-2%). Alrededor del 10% de la materia orgánica son compuestos fenólicos, principalmente polímeros de alto peso molecular como taninos, antocianinas y catequinas (Hamdi y col., 1991) que poseen una estructura similar a la lignina (Ramos-Cormenzana, 1986). Estos compuestos fenólicos son los

responsables del color oscuro y de sus características fitotóxicas y antimicrobianas (principalmente antibacterianas) (Martínez y col., 1986; Peredes y col., 1986; Capasso y col., 1992; Pérez y col., 1992; Ramos-Cormenzana y col., 1996).

El tratamiento biológico de los efluentes OMW mediante digestión anaeróbica ha sido muy investigada por diferentes autores (Fiestas y col., 1982; Rozzi y col., 1989; Martín y col., 1991), varios de los cuales han descrito que los efectos inhibitorios sobre las bacterias metanogénicas causados por las altas concentraciones de los compuestos aromáticos presentes en estos efluentes, dificultan este sistema de depuración (Boari y col., 1984). El problema ha sido solucionado parcialmente diluyendo los efluentes, además de que se ha demostrado que un tratamiento aerobio previo con *Aspergillus niger* (Borja y col., 1995) o con *Geotrichum candidum* mejora el proceso de la digestión anaerobia, debido a la disminución de los inhibidores fenólicos (Borja y col., 1992). En este contexto, la utilización de hongos con una eficacia ligninolítica probada y, por lo tanto, con una alta capacidad de degradar compuestos relacionados con la lignina como los polifenoles, representa una perspectiva prometedora en el tratamientos de los residuos procedentes de este tipo de industrias que utilizan materias primas vegetales en sus procesos (Archibald y col., 1990; Bergbauer y col., 1991; Sayadi y Ellouz, 1992).

Un paso importante en la degradación de los efluentes OMW es la ruptura de polímeros fenólicos coloreados (decoloración) a monómeros que pueden ser consecutivamente mineralizados (Sayadi y Ellouz, 1992; Vinciguerra y col., 1995). La decoloración por *Phanerochaete chrysosporium*, de estos efluentes, fue primeramente reportada por Pérez y colaboradores, en 1987. En los últimos años, el estudio de la decoloración de OMW por diferentes hongos de podredumbre blanca se ha intensificado (Sayadi y Ellouz, 1992; Vinciguerra y col., 1995; Martirani y col., 1996; Pérez y col., 1998; Robles y col., 2000; Iconomou y col., 2000; Kissi y col., 2001; Dias y col., 2004). Se ha mostrado que hay una correlación importante entre la decoloración de este efluente OMW y la reducción del carbono orgánico total y de los compuestos fenólicos (Boominathan y col., 1993; Morrison y Mulder, 1994; Sayadi y Ellouz, 1995; Vinciguerra y col., 1995).

En nuestro trabajo se observó que los tratamientos con *C. gallica* dan lugar a una disminución importante tanto de las unidades de color del efluente como de su demanda química de oxígeno. En el medio 7 líquido se obtuvo una decoloración del efluente de alrededor del 50%, en las tres concentraciones ensayadas y la disminución de la DQO fue de alrededor del 65%. A su vez, se observaron importantes disminuciones de las fracciones polifenólicas obtenidas mediante la precipitación con ácido, de las muestras tomadas en diferentes días de tratamiento, que fueron del 90% en concentraciones de efluente de 20% y 40% y una disminución del 60% en los medios con 60% de efluente. Estos valores tan altos de disminución de las fracciones polifenólicas fueron acompañados de valores de decoloración de tan sólo un 50%, que podría explicarse por la posible

capacidad de *C. gallica* para degradar los compuestos poliméricos fenólicos a compuestos de más bajo peso molecular, lo que no necesariamente debe corresponderse con una disminución del color. Estudios realizados en el tratamiento de efluentes OMW con *Lentinus edodes* inmovilizado sobre poliuretano (D'Annibale y col., 1998) han mostrado una reducción del color y de los compuestos aromáticos de naturaleza fenólica combinada con cambios en la distribución del tamaño molecular de la fracción polimérica soluble en agua. Esta despolimerización de la fracción de alto peso molecular fue observada en el segundo y tercer ciclo de tratamiento, donde ocurrió la producción simultánea de lacasa y manganeso peroxidasa y, sin embargo, no se produjo un alto grado de decoloración del efluente, lo que indicaba que el metabolismo degradativo de estos compuestos no estaba combinado con la disminución del color del efluente. Jaouani y colaboradores (2003) estudiaron la decoloración de efluentes OMW con *Corioloropsis polyzona* en medios con 50 g/L de DQO y observaron una decoloración del 75%, después de 20 días de incubación, asociada a la degradación de compuestos aromáticos de bajo y alto peso molecular, indicando una posible despolimerización de la fracción pesada de los polifenoles y una degradación de los compuestos de bajo peso molecular.

Nuestras hipótesis respecto a la degradación del efluente por *C. gallica* resultan respaldadas por el análisis de los resultados de este proceso mediante Pi-CG-EM, donde, en general, se observaron cambios en las muestras tratadas con *C. gallica* respecto a los controles. Entre estos cambios se encontraron, por un lado, la disminución de las áreas relativas de algunos productos de pirólisis que podría estar asociada con una degradación de los compuestos polifenólicos del efluente, por acción del hongo. Por otro lado, se observó el incremento en las cantidades relativas de otros compuestos, posiblemente asociado al aumento de proteínas en los medios de cultivo y a las modificaciones en la estructura de los taninos presentes en el efluente.

En los ensayos realizados con medio Kirk con diferentes concentraciones de glucosa sin fuente de carbono y con sorbosa, pudo observarse como *C. gallica* produjo mejores resultados de decoloración en aquellos casos en los que este hongo se cultivó en condiciones desfavorables o estresantes para su crecimiento. Así, en los medios sin fuente de carbono o con sorbosa (carbohidrato poco metabolizable) los porcentajes de decoloración alcanzados en el último día de tratamiento fueron del 96% y 98%, respectivamente. Los niveles de actividad lacasa en estos casos fueron muy superiores a los detectados en los controles, corroborándose el posible efecto inductor del efluente sobre la actividad de la enzima y un posible mecanismo de regulación de la actividad enzimática mediado por la fuente de carbono. Estudios realizados por Zapico en 1999 indicaron que en el basidiomiceto *C. gallica* la expresión de lacasas podrían estar asociada a condiciones de estrés y constituir un mecanismo compensatorio ante la carencia de nutrientes en el entorno.

En el presente trabajo, el aumento de los niveles de actividad lacasa se detectó en los primeros días de crecimiento del hongo en presencia del efluente, lo que sugiere que esta enzima se produce durante la fase del metabolismo primario. Estos mismos resultados han sido descritos por diversos autores en el tratamiento de efluentes OMW e indican que los hongos de podredumbre blanca aumentan la producción de las lacasas implicadas en la desintoxicación del medio de cultivo para favorecer el crecimiento microbiano (Tomati y col., 1991; Tsioulpas y col., 2002). Con respecto a las posibilidades de futuras aplicaciones biotecnológicas, esta característica representa una ventaja para la utilización de reactores continuos en los cuales las reacciones biológicas estarían asociadas al metabolismo primario del crecimiento del hongo, con lo cual serían sistemas más productivos que aquellos que se producen en el metabolismo secundario.

Hay que destacar que en ninguno de los cultivos realizados en medios con efluente se observó color asociado al micelio. Por esta razón la decoloración puede atribuirse a la acción degradativa del hongo sobre los compuestos coloreados, y no a una simple adsorción de los mismos.

Tanto los resultados de la decoloración en medios sólidos, incluso a concentraciones elevadas del efluente como los altos porcentajes de decoloración, cercanos al 100%, en medios líquidos en tan sólo 15 días de tratamiento con el hongo, ponen de manifiesto la alta capacidad de *C. gallica* para degradar este efluente derivado de la industria cervecera y que este hongo se revela como una buena alternativa dentro del grupo de los basidiomicetos con perspectivas para futuras aplicaciones biotecnológicas.

4.2. Posible efecto inhibitorio de los componentes fenólicos del efluente sobre el crecimiento de *C. gallica*.

Son bien conocidos los efectos tóxicos de los compuestos fenólicos de tipo tanino sobre el crecimiento de muchos microorganismos (Scalbert, 1991; Reed, 1995; Chung y col., 1998; Zhao y Kwan, 1999; Latte y Kolodziej, 2000). Estudios realizados con diversos efluentes industriales, como los derivados de la extracción de aceite de oliva, han demostrado que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos, principalmente polifenoles y taninos, responsables de las características de fitotoxicidad y de la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano que presentan este tipo de efluentes (Martínez y col., 1986; Peredes y col., 1986; Capasso y col., 1992; Borja y col., 1992; Pérez y col., 1992; Ramos-Cormenzana y col., 1996; Kissi y col., 2001). El efluente utilizado en este estudio presenta un elevado contenido polifenólico (1,5 g/L) representado fundamentalmente por taninos (1,08 g/L).

Una primera aproximación hacia la posible inhibición del crecimiento de *C. gallica* por los componentes fenólicos del efluente, nos la dio el que este hongo no fue capaz de crecer en medios de cultivo con 100% de efluente.

En estudios realizados en medio 7 líquido, con distintas concentraciones de efluente, se observó como el crecimiento de *C. gallica*, medido como peso seco micelial, se veía afectado cuando el medio contenía una concentración elevada de efluente (60%)(V₃). Los valores de peso seco del micelio, en el día 6 de cultivo fueron bastantes más bajos que los obtenidos en las muestras que contenían 20% (V₁) y 40% (V₂) de efluente. Sin embargo, los resultados de la segunda semana de tratamiento indicaron como el hongo, una vez superada esta supuesta fase de adaptación al medio, entró en una fase de crecimiento exponencial llegando incluso a obtenerse valores de peso seco del micelio superiores a los encontrados en las muestras que contenían concentraciones de efluente más bajas. Los basidiomicetos son organismos quimio-organotróficos y tienen la capacidad de utilizar varias fuentes orgánicas de carbono para su metabolismo (Fell y col., 2001), con lo que el aumento de biomasa obtenido en las muestras V₃ con la más alta concentración de efluente (60%), en la última semana de biotratamiento con el hongo, sugieren que los compuestos orgánicos presentes en este efluente, fueron utilizados por el hongo para su crecimiento.

Además, pudo observarse una relación aparente entre este retraso en el crecimiento del hongo en las muestras V₃ (60% efluente) y los resultados obtenidos de decoloración y reducción de DQO. La decoloración y la reducción de DQO apenas se produjeron en la primera semana de cultivo, encontrándose un aumento de las unidades de color de los medios de incubación. En la segunda semana de incubación, los procesos de decoloración y de reducción de la DQO alcanzaron una alta eficiencia, como indicaron los resultados logrados desde el día 6 al día 12 del tratamiento en la muestra V₃.

El aumento del color del medio pudo ser debido a la producción de pigmentos por el hongo, como ha sido reportado por Bergbauer y Eggert (1993) en algunos hongos de podredumbre blanca como *Trametes versicolor*. Sin embargo, un incremento de color debido a la actividad lacasa no debe ser descartado bajo estas condiciones experimentales. Bollag y colaboradores (1988) observaron la adaptación del hongo a los compuestos fenólicos tóxicos por medio de la actividad de una lacasa que era capaz de mediar la detoxificación de compuestos fenólicos contaminantes, catabolizando su polimerización para formar fenoles que resultaban de menor toxicidad para las células.

En estudios realizados por Mansur y colaboradores (1997) se sugirió que el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62 podía producir actividad lacasa como una respuesta adaptativa, desarrollada por el hongo, para oxidar los compuestos presentes en vinazas de destilería y disminuir su efecto

tóxico. Carbajo y colaboradores, en 2002, observaron que en cultivos de *C. gallica* en presencia de ácido tánico, se producía un aumento en las unidades de color del medio, que coincidió con la producción de la actividad lacasa, lo que sugirió el papel propuesto de las lacasas en la detoxificación de compuestos fenólicos mediante reacciones de polimerización (Thurston 1994; Collins y Dobson, 1997; Soden y Dobson, 2001). Además, que este aumento de color fuera desapareciendo con el tiempo de incubación, paralelamente a la detección de valores crecientes de actividad lacasa, apuntó hacia la implicación de las lacasas en la degradación de estos compuestos, sin desatender la posible participación de otras enzimas.

Estudios realizados con el basidiomiceto *Euc-1* (Dias y col., 2004) en medios conteniendo 20% de efluente OMW mostraron como este hongo mostraba una fase de adaptación, coincidiendo con un retraso en la producción de lacasa, en comparación con los cultivos crecidos en el medio líquido definido (controles). Sin embargo, al final del período de incubación en el medio con estos efluentes, se observó que la biomasa casi se había duplicado y que la actividad lacasa había aumentado aproximadamente seis veces. El aumento en la producción de la biomasa sugirió que los compuestos orgánicos de estos efluentes fueron utilizados como fuentes de carbono y energía por el hongo. Sin embargo, el aumento observado de la actividad lacasa en presencia del efluente podría ser explicado como una respuesta fisiológica del hongo para superar los efectos tóxicos de algunos compuestos presentes en el efluente (Thurston, 1994), o bien por un supuesto fenómeno de inducción, tal como ocurre cuando se utilizan compuestos como la xilidina o el ácido ferúlico para inducir estas enzimas (Pérez y col., 1998; Soden y Dobson, 2001). Otros autores, sin embargo, en estudios con este tipo de efluentes, han mostrado como algunos de los productos de la reacción de oxidación producida por la lacasa y/o el resto de los compuestos fenólicos de esta degradación resultaban ser más tóxicos para los hongos que los componentes del efluente originales (Martirani y col., 1996; Iconomou y col., 2000; Tsioulpas y col., 2002).

Nuestra hipótesis es que la alta proporción de polifenoles presente en la muestra V₃, pudo ser tóxica para *C. gallica*, inhibiendo su crecimiento normal durante los seis primeros días de cultivo. La lacasa fúngica pudo ser secretada gradualmente al medio extracelular detoxificando estos compuestos aparentemente por medio de la polimerización de los mismos. Esto está en concordancia con el incremento en las unidades de color observado durante la primera semana de tratamiento, con el aumento en los valores gravimétricos de la fracción polifenólica precipitada con ácido y con las muchas publicaciones que sostienen un efecto detoxificante de las fenoloxidasas, vía polimerización de fenoles (Bollag y col., 1988; Scalbert, 1991; Thurston, 1994; Soden y Dobson, 2001).

En nuestros cultivos en medio 7 con efluente no se pudo realizar la medida de actividad lacasa, sin embargo, en estudios realizados por Calvo y colaboradores (1998), encontraron altos niveles de

actividad lacasa en cultivos de *C. gallica* en medio 7 con efluente procedente de la industria papelera. Además, esta hipótesis, del efecto detoxificador del efluente por medio de la acción de lacasas, puede ser respaldada por los resultados obtenidos en medio de Kirk cuando es suplementado con 40% de efluente (v/v) en donde la producción de la actividad lacasa fue 20 veces superior a la actividad presente en los medios sin efluente. Al igual ocurrió en los cultivos en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente donde los valores de actividad lacasa detectados fueron unas 50 veces superiores a los observados en el medio control. En ambos casos, pudo observarse como la máxima decoloración coincidió con los máximos valores de actividad lacasa, observándose un oscurecimiento del medio los primeros días de la cinética y al final del tratamiento el crecimiento del hongo fue mayor, formando agregados de micelio más grandes con respecto a los medios controles.

4.3. Importancia de la actividad lacasa en el tratamiento del efluente de la industria cervecera.

En los diferentes ensayos realizados en medios líquidos, además de la actividad lacasa fueron ensayadas espectrofotométricamente las actividades de las enzimas ligninolíticas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en las muestras de los medios de cultivo. En ninguno de los cultivos realizados se detectó actividad de ninguna de estas enzimas, aunque por ello, no puede descartarse el papel de estas enzimas en la decoloración del efluente, pues debe tenerse en cuenta que para realizar las mediciones de su actividad en presencia del mismo, fue necesario realizar diluciones del medio de cultivo, debido a la fuerte interferencia del color del efluente en las mediciones espectrofotométricas.

El efluente objeto de este estudio, como se ha visto en el apartado 3.1. de Resultados, esta formado fundamentalmente por compuestos polifenólicos de tipo tanino. La enzima tanasa, (EC 3.1.1.20), cataliza la esterificación de ácido tánico a ácido gálico y glucosa y muchos microorganismos, especialmente hongos, han sido descritos como productores de esta enzima en ambas formas, ligada a membrana y extracelular (Bradoo y col., 1996). Los resultados obtenidos en el estudio realizado para comprobar la producción de tanasa por *C. gallica* sugieren que este hongo probablemente no produzca este tipo de enzima con lo cual la degradación de los componentes del efluente no puede ser atribuida a esta actividad, al menos en las condiciones de ensayo estudiadas en el presente trabajo.

En un estudio, realizado en nuestro laboratorio, con cultivos de *C. gallica* en presencia de ácido tánico, se analizaron espectrofotométricamente las actividades de enzimas ligninolíticas de tipo peroxidasa, tiroxinasa y lacasa. En ninguno de los casos ensayados se detectaron estas actividades enzimáticas salvo la lacasa, que fue fuertemente inducida por este compuesto (Carbajo, 2001).

Estas actividades peroxidadas han sido también evaluadas en distintos estudios en presencia de efluentes de la industria papelera (Calvo y col., 1998) y con diferentes condiciones de cultivo (Zapico, 1999) sin ser detectadas hasta el momento en este hongo.

Estudios realizados por diferentes autores sobre la degradación de efluentes derivados de la industria del aceite de oliva concluyen que existen varias líneas de evidencia que sugieren que la lacasa está involucrada en la biotransformación de estos efluentes. Primeramente, el incremento de la actividad lacasa en cultivos que contienen estos efluentes ha sido reportado por diversos autores en hongos de podredumbre blanca, como *Lentinus edodes* (Vinciguerra y col., 1995), *Pleurotus ostreatus* (Martirani y col., 1996), *Pleurotus* spp. (Tsioulpas y col., 2002), *Phanerochaete flavid-alba* (Pérez y col., 1998; Ruiz y col., 2002) y basidiomiceto *Euc-1* (Dias y col., 2004), entre otros. En segundo lugar, la incubación de estos efluentes con lacasa de diversos basidiomicetos resulta en una reducción del contenido de fenoles presentes en el efluente (Martirani y col., 1996; D'Annibale y col., 2000; Tsioulpas y col., 2002). Y en tercer lugar, *Phanerochaete chrysosporium* ha presentado una gran eficiencia para decolorar este tipo de efluente, aunque hasta la fecha no ha sido reportada actividad lacasa en este hongo salvo en un contradictorio trabajo de Srinivasan y colaboradores (1995) y por tanto en los estudios previos no se habían centrado en el papel desempeñado por la lacasa. Por lo que se confirma que estos efluentes tienen influencia sobre la producción de las enzimas ligninolíticas de los hongos basidiomicetos, y que la lacasa de muchos de ellos es fuertemente inducida en estos cultivos.

En todos nuestros resultados se ha observado un aumento significativo de la actividad lacasa en los medios suplementados con efluente. En los estudios realizados en medio Kirk con sorbosa y 40% de efluente fue donde se obtuvieron los mejores resultados de decoloración, que alcanzó valores próximos al 98% en el último día de biotratamiento con el hongo. En estas condiciones se observó un gran incremento de la actividad lacasa (50 veces) con respecto al medio control, que también se produjo a nivel de la expresión del gen. Además, pudo observarse que el alto nivel de transcritos, en el medio con efluente, coincidió con la máxima decoloración y que la disminución en la velocidad de decoloración coincidió con la pérdida de actividad lacasa. Esta asociación se confirmó mediante el análisis de la correlación entre los niveles de transcritos y la velocidad de decoloración. El coeficiente de correlación fue del 87,4%, lo que significa que en esa medida la variación de la decoloración dependió de la actividad lacasa. Estos estudios ponen en evidencia los complejos procesos de expresión de los genes donde la composición del medio de cultivo juega un importante papel (Broda y col. 1996).

Se realizó, además, una comparación entre los niveles de actividad lacasa detectados en los diferentes días de cultivo y la variación de la decoloración en esos mismos días. Al comparar las curvas que representan el comportamiento de estas variables se pudo apreciar que ambas tenían una

gran similitud en su forma lo que sugirió que podían estar estadísticamente relacionadas. Para confirmar esta hipótesis se realizó el análisis de regresión y se calculó el coeficiente de correlación, que fue del 90,5 %. De esta manera se confirmó que en las condiciones de máxima decoloración del efluente por *C. gallica*, la misma estuvo asociada significativamente con los niveles de actividad lacasa producida por el hongo. Estos resultados nos conducen a deducir que la actividad lacasa extracelular parece desempeñar un papel significativo en la degradación de este efluente procedente de la industria cervecera. Sin embargo, sería prematuro descartar la participación de otras enzimas como las peroxidasas o enzimas intracelulares productoras de peróxido de hidrógeno que han demostrado desempeñar un papel importante en la degradación de efluentes en otras especies de hongos basidiomicetos.

Finalmente, el ensayo realizado con caldos enzimáticos con alta actividad lacasa mostró una reducción de las unidades de color del efluente, en las primeras 24 horas de tratamiento. A partir de aquí la decoloración prácticamente dejó de producirse coincidiendo con la pérdida de la actividad lacasa. La decoloración, al final del tratamiento, fue de un 14%. Estos resultados sugieren una posible relación entre decoloración y actividad lacasa ya que la disminución de las unidades de color ocurre cuando en los caldos existe actividad lacasa y cuando ésta se reduce hasta un 80% de su valor inicial, en el tercer día de tratamiento, la decoloración deja de producirse. Es importante destacar que en estos caldos se midieron las actividades de las enzimas lignina y manganeso peroxidasa no detectándose ninguna de ellas.

D'Annibale y colaboradores (2000), realizaron un ensayo de la degradación de un efluente procedente de la industria del aceite de oliva, incubando este efluente con 5, 10 y 50 unidades de actividad lacasa de la cepa *Lentinus edodes*, durante 2 horas a 35°C, produciéndose una disminución de 42, 65 y 78%, respectivamente del contenido total de fenoles presente en el efluente. En nuestro ensayo se utilizó 1 unidad de actividad lacasa, por lo que, aunque ni los efluentes ni las condiciones son las mismas y no pueden compararse, el valor de decoloración más bajo obtenido en nuestro estudio (14%) puede deberse a la poca cantidad de enzima utilizada en el tratamiento. Aunque hay que señalar que el principal inconveniente en este experimento fue la poca estabilidad de la enzima en estas condiciones, en presencia del efluente. Tsioulpas y colaboradores (2002) en estudios realizados con *Pleurotus* spp. en el tratamiento de efluentes OMW observaron como la actividad lacasa, después de 12 días de incubación disminuía rápidamente. Un experimento complementario con lacasa comercial demostró que la actividad lacasa se reducía, también rápidamente, en presencia de estos efluentes, demostrando que tal disminución era independiente de la presencia del hongo. Una explicación posible es que los productos generados por la lacasa inhibían a la enzima por sí mismos. Sin embargo, en este experimento observaron una precipitación de la proteína en el efluente OMW en paralelo a la reducción de la actividad lacasa.

Por lo tanto, podría concluirse que podría ocurrir una precipitación de la lacasa junto con los polímeros insolubles en agua formados por los productos de la reacción de la enzima. Los productos de reacción de la lacasa se polimerizan espontáneamente para formar agregados insolubles en agua (Martirani y col., 1996). En nuestro ensayo podría estar ocurriendo algo similar ya que los taninos, presentes en nuestro efluente, tienden a formar enlaces covalentes con las proteínas mediante reacciones de polimerización oxidativa como resultado, entre otros, de la acción de una polifenoloxidasas, como es el caso de la lacasa (Reed, 1995). Además, los taninos son considerados inhibidores de enzimas, mediante la privación de sustratos y de iones metálicos (Reed, 1995; Chung y col., 1998), por lo que pudieran estar inhibiendo la actividad de la enzima lacasa. Todo esto son explicaciones tentativas que requieren confirmación, pero de lo que no cabe duda es de la importancia de la lacasa en la degradación de este efluente.

4.4. El efluente de la industria cervecera como posible inductor de la actividad lacasa.

Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca, en general, muestran gran diversidad en su respuesta a las sustancias que pueden actuar como inductores potenciales de las lacasas. En principio, estas diferencias sólo se describieron a nivel bioquímico, pero actualmente el avance de los estudios moleculares ha permitido comprobar que las respuestas a un mismo inductor en diferentes especies de hongos, e incluso en genes de una misma familia de lacasas en determinados organismos, pueden variar por estar sometidos a una regulación diferencial de la transcripción (Mansur y col., 1998; Palmieri y col., 2000; González 2001; González y col., 2003b).

Es bien conocido que los compuestos aromáticos pueden desempeñar un papel fundamental en la inducción de la actividad lacasa en los basidiomicetos. En 1953, Fåhræus y Lindeberg describieron que la producción de lacasas en diversas especies de *Polyporus* (*Trametes*) estaba influenciada por la adición de compuestos fenólicos al medio de cultivo. Posteriormente numerosos autores han continuado estudiando el efecto de gran variedad de compuestos aromáticos sobre la actividad lacasa de distintas especies de hongos, entre estos compuestos se encuentran sustancias como flavonoides (Pickard y Westlake, 1970; Ardon y col., 1998), ácidos ferúlico, vainílico y *p*-hidroxibenzoico (Leonowicz y Trojanowski, 1975; Farnet y col., 1999; González, 2001) ácido tánico (Carbajo y col., 2002), 2,5-xilidina (Eggert y col., 1996b), alcohol veratrílico (Mansur y col., 1997; Scheel y col., 2000; Arana-Cuenca y col. 2004), ácidos aromáticos fenólicos y no fenólicos (Sethuraman y col., 1998), así como distintas sustancias fenólicas de bajo peso molecular (Koroljova-Skorobogat'ko y col., 1998). Además de esta lista de inductores potenciales de lacasa, se ha demostrado recientemente que algunos alcoholes alifáticos (Lee y col., 1999) y efluentes lignocelulósicos (Lorenzo y col., 2002) también tienen un efecto similar.

El incremento en los niveles de actividad lacasa en *C. gallica* y otros hongos de podredumbre blanca debido a la presencia de diversos tipos de efluentes industriales, en los medios de cultivo, ha sido observado con frecuencia (Ardon y col., 1998; Pérez y col., 1998; Calvo y col., 1998; González y col., 2000; Tsioulpas y col., 2002), y la presencia de taninos ha sido descrita en algunos de estos estudios (Maestro-Durán y col., 1993; Yagüe y col., 2000). Así, se ha visto como el basidiomiceto *C. gallica* produce un aumento en el nivel de la actividad lacasa cuando en el medio de cultivo existe la presencia de efluentes de la industria papelera (Calvo y col., 1998; Zapico, 1999). Carbajo y colaboradores (2002), estudiaron el efecto del ácido tánico, como posible inductor de la producción de la actividad lacasa en *C. gallica*, produciéndose un aumento evidente de los niveles de lacasa extracelular, corroborados con un aumento en los niveles de transcripción del gen *cglcc1*, cuando el hongo era crecido en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de ácido tánico.

Resultados similares se obtienen con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62, cuando es cultivado en presencia de efluentes de la industria de destilación de alcohol a partir de mieles de caña (Mansur y col., 1997; González y col., 2000; González, 2001), sugiriendo un efecto inductor de este efluente sobre los distintos genes de lacasa de este basidiomiceto.

Nuestros resultados obtenidos en medios de cultivo con 40% de efluente apuntan también a una posible inducción de la actividad lacasa de *C. gallica* en presencia del efluente. Así, cuando este hongo fue crecido en medio Kirk con efluente (40%) la actividad lacasa detectada fue 20 veces superior a la encontrada en los medios controles. Igual ocurrió cuando este medio fue modificado variando la fuente de carbono, entonces, la actividad lacasa detectada fue 100 veces superior al control, en los medios con glucosa 5X (50g/L), y 16 veces superior en los medios sin fuente de carbono. En el medio Kirk, que contenía sorbosa, se observó un incremento de 50 veces en los niveles de actividad lacasa extracelular detectados en estos medios con efluente con respecto a los controles, correlacionados con un aumento en los niveles de la transcripción del gen *cglcc1* de *C. gallica*. Con lo que el efecto de inducción del efluente se estaría produciendo a ambos niveles, a nivel de la actividad lacasa extracelular y a nivel de la expresión del gen.

Efluentes derivados de la extracción del aceite de oliva han mostrado ser inductores de la actividad lacasa de diversos hongos basidiomicetos. Estos efluentes contienen catecol, ácido cafeico, 3,4-dihidroxifeniletanol y otros compuestos aromáticos (D'Annibale y col., 2000), que son tóxicos para los microorganismos, pero a la vez inductores potenciales de las lacasas (Tomati y col., 1991; Martínez-Nieto y col., 1992; Piperidou y col., 2000). Este es un efecto normal producido por moléculas extremadamente tóxicas, como los diferentes tipos de xilidina, que resultan ser uno de los mejores inductores de actividad lacasa en hongos (Soden y Dobson, 2001).

Tsioulpas y colaboradores, en 2002, observaron una inducción de la actividad lacasa de *Pleurotus* spp. en medios que contenían el 75% de este tipo de efluentes y observaron que la inducción de la actividad lacasa dependió de la proporción de los efluentes en el medio del crecimiento. Los valores más altos de actividad fueron detectados cuando el efluente contenía una concentración fenólica de 2,55 g/L. Tomati y colaboradores (1991) observaron como la máxima actividad lacasa se producía en cultivos de *Pleurotus ostreatus* en presencia del efluente derivado de la industria del aceite cuando el contenido fenólico del mismo era de 1,5 g/L. El efluente utilizado en este estudio posee una concentración fenólica de 1,5 g/L, si bien en nuestros resultados no podemos apreciar una relación entre la inducción y la concentración fenólica ya que todos nuestros estudios, en los que se detectó actividad lacasa, fueron realizados en medio líquido con la misma concentración del efluente (40%). En un futuro, sería interesante abordar un estudio desde este punto de vista para poder optimizar las condiciones de cultivo de manera que se obtenga una mayor actividad lacasa extracelular, con el objetivo de una posible aplicación biotecnológica.

Pérez y colaboradores (1998) utilizaron el basidiomiceto *Phanerochaete flavid-alba* en el tratamiento de estos mismos efluentes (OMW) y observaron una gran inducción de la actividad lacasa en los cultivos conteniendo estos efluentes. Los resultados de esta publicación confirman que este efluente tiene influencia sobre la producción de las enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete flavid-alba*, que las enzimas manganoso peroxidasa son las enzimas predominantes en la decoloración por *P. flavid-alba*, y que la lacasa, no solamente está presente sino que es fuertemente inducida en tales cultivos.

El efluente objeto de nuestro estudio contiene, entre otros, taninos y compuestos fenólicos que han sido demostrados como inductores de la actividad lacasa de diversos hongos. En los estudios realizados en la caracterización del efluente por la técnica de Pi-CG-EM se detectaron productos de pirólisis como el guaiacol, catecol, 2,6-dimetoxifenol y 4-vinilguaiacol. El guaiacol fue utilizado por Robles y colaboradores (2000) en el medio de cultivo para el crecimiento de nueve cepas del hifomiceto *Chalara paradoxa*, aisladas de las aguas residuales de los molinos de aceitunas, para inducir síntesis de lacasas. Estudios de inducción de la actividad lacasa realizados en nuestro laboratorio, con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62, mostraron que el guaiacol fue el mejor de los monómeros aromáticos ensayados como inductores tanto a nivel de la actividad lacasa extracelular, como a nivel de la expresión de los genes de lacasa (González, 2001). Otros estudios con diez Trametoides demuestran la capacidad del alcohol veratrílico para inducir actividad lacasa en la mayor parte de las cepas ensayadas (Arana-Cuenca y col. 2004). El catecol, presente en efluentes OMW, también fue detectado como producto de pirólisis de las muestras analizadas de nuestro efluente y ha sido descrito como un inductor de la actividad lacasa. Otros de los productos detectados en la caracterización del efluente de la industria cervecera fueron el 2,6-dimetoxifenol y

el 4-vinilguaiacol. Este último compuesto ha sido descrito como producto de pirólisis del ácido ferúlico, el cual ha mostrado ser un inductor de la actividad lacasa de los basidiomicetos *Marasmius quercophilus* (Farnet y col., 1999), *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 (Otterbein y col., 2000) y *Trametes* sp. I-62 (González, 2001). El 2,6-dimetoxifenol y el 4-vinilguaiacol fueron analizados como inductores de la actividad lacasa del basidiomiceto *Trametes* sp. I-62, obteniéndose buenos resultados de aumento de la actividad lacasa a nivel extracelular (González, 2001).

En uno de los trabajos más recientes con este tipo de efluentes procedentes de la industria del aceite de oliva, Díaz y colaboradores (2004) observaron como el basidiomiceto *Euc-1* mostró una alta capacidad para disminuir los compuestos fenólicos presentes en el efluente. Dos fracciones de lacasa (Lac1 y Lac2) fueron separadas por cromatografía. El efluente indujo fuertemente la producción de Lac2 que estaba casi ausente en medio líquido definido. Además, Lac2 era la fracción principal de lacasa en presencia de estos efluentes. En el presente trabajo, los estudios realizados mediante la electroforesis de las proteínas nativas contenidas en las muestras procedentes de los distintos ensayos, en cultivos líquidos, mostraron una inducción del efluente sobre la actividad lacasa detectada. Los resultados observados en estos geles de proteínas con actividad lacasa sugieren la posibilidad de que el efluente esté potenciando o induciendo la actividad de otras isoformas de la proteína, o de otras proteínas distintas, que no son detectadas en los medios controles, debido a los diferentes patrones de proteínas observados. Así, en las muestras con efluente se observaron dos bandas de lacasa muy intensas, en los días de máxima decoloración y actividad en el medio de cultivo, que no se detectaron en los medios controles, en los que sólo apareció una banda de lacasa. Además, en aquellos días de tratamiento con *C. gallica* en los que se produjo un aumento en las unidades de color en los medios de cultivo, apareció otra banda, de más bajo peso molecular aparente, que no se detectó en otros días del ensayo. Como se sabe, las enzimas ligninolíticas son familias de proteínas que muestran diferencias en la especificidad de sustrato y con funciones diferenciadas y que se activan de acuerdo a las condiciones de crecimiento (Pasti-Grigsby y col., 1992; Mansur y col., 2003). *Panus tigrinus* produce diferentes tipos de lacasa que tienen funciones de desfenolización, polimerización y una de ellas evita reacciones de repolimerización (Leontievsky y col., 1999). Es posible que, en estas condiciones, se esté potenciando la producción de posibles isoformas de la proteína lacasa, de entre las cuales una de ellas puede estar produciendo reacciones de polimerización del efluente, aumentando el color del mismo (Leonowicz y col., 2001).

El aspecto estrellado de los agregados del micelio fue uno de los cambios morfológicos ocurridos en los cultivos en los que se observó una mayor inducción de la actividad lacasa, y la aparición de las protuberancias del micelio, en estos medios con efluente, coincidió en general con

los máximos de actividad de la enzima. Mansur y colaboradores (1997) describieron esta misma morfología en cultivos de *Trametes* sp. I-62 crecidos en cultivos con altas concentraciones de nitrógeno, en los cuales se detectó inducción de la actividad lacasa. Estudios realizados con esta misma cepa, con efluentes derivados de la producción de alcohol a partir de melazas de caña de azúcar y con sustancias inductoras de la actividad lacasa de este hongo, mostraron como se producía el aspecto estrellado de los agregados del micelio en estas condiciones en las cuales se produjo una inducción de las distintas actividades lacasa de este hongo a nivel de la expresión de sus genes (González, 2001). Por lo que se sugiere que la formación de protuberancias podría ser un mecanismo, desarrollado por el hongo, para favorecer la liberación de grandes cantidades de la enzima, al medio de cultivo, a través del aumento de la superficie de excreción y a su vez acelerar los procesos de degradación.

De todos estos resultados podemos deducir que el efluente procedente de la industria cervecera en sí mismo o los diferentes compuestos fenólicos que contiene, actúan como inductores de la actividad lacasa del basidiomiceto *C. gallica*.

4.5. El gen *cglcc1A*: ¿Un alelo de *cglcc1*?

La identificación de un gen de lacasa en *C. gallica*, el gen *cglcc1*, fue descrita por Calvo en 1995. En el mencionado estudio, la autora, tras observar el análisis de Southern blot, sugería la posibilidad de que o bien existen dos o más genes de lacasa en este hongo o que el gen descrito produce las distintas formas enzimáticas detectadas en diferentes experimentos. Calvo y colaboradores (1998) observaron que la secuencia del extremo amino terminal de la proteína, que se dedujo de la secuencia del gen *cglcc1* de *C. gallica*, no coincidía con la de la proteína purificada a partir de los sobrenadantes de cultivos de *C. gallica* en medio Kirk. Al realizar un estudio mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes para analizar la proteína purificada observaron una única banda que correspondía a un peso molecular de 84 kDa, mientras que al realizar la electroforesis en condiciones no desnaturizantes se detectaron cuatro bandas, cuyo punto isoelectrónico fue analizado, mediante isoelectroenfoque, y correspondió para tres de ellas a 4,15, 4,20 y 4,27. El que solamente fueran detectadas tres bandas de actividad en el isoelectroenfoque indicó que dos de las bandas que aparecieron en la electroforesis en condiciones no desnaturizantes, contenían el mismo punto isoelectrónico. Todos estos datos les llevó a concluir que estas cuatro bandas de lacasa podrían ser debidas a isoenzimas que diferían en el grado de glicosilación o en otras modificaciones postranscripcionales y sugirieron la posibilidad de la existencia de distintas formas alélicas que pudieran explicar la producción de estas isoenzimas.

Zapico, (1999), realizó diversos estudios en busca de un segundo gen de lacasa en *C. gallica*, sin embargo, no obtuvo ningún resultado que permitiera demostrar la existencia de un nuevo gen.

A pesar de ello, observó diferentes formas enzimáticas en los zimogramas de lacasas realizados en condiciones de decoloración de efluentes procedentes de la extracción de celulosa de *Eucalyptus globulus* mediante un tratamiento termo-alcálico, o en presencia de compuestos como el colorante polimérico Azul de Ramazol. En los zimogramas este autor observó un patrón de dos bandas más intensas que se detectaban en condiciones de decoloración. Estas dos bandas intensas también fueron detectadas en nuestro trabajo en condiciones de máxima decoloración del efluente de la industria cervecera así como en los trabajos realizados por Calvo (1995) en cultivos de *C. gallica* con efluente alcalino de una industria papelera.

En 1999, Zapico realizó la síntesis, clonaje y secuenciación del ADNc del gen *cglcc1A* de *C. gallica*. A través de la comparación de la secuencia del ADNc con la correspondiente al ADN genómico, se confirmaron las estructuras predichas por Calvo (1995), en cuanto al número de intrones y su disposición, y se dedujo la secuencia de la proteína correspondiente. La discusión de las características estructurales de este gen, y su relación evolutiva con los genes de lacasa de otros basidiomicetos se analiza ampliamente en los trabajos de Calvo (1995) y Zapico (1999).

En el presente trabajo se aisló, clonó y secuenció un ADNc de lacasa de *C. gallica* cuya secuencia difiere en 9 sustituciones de bases respecto a la del gen *cglcc1*, lo que implica una identidad del 99,2% a nivel de las proteínas. La realización de un análisis de PCR-RFLP permitió aislar la secuencia correspondiente de ADN genómico y confirmar varias de las diferencias debidas a estas sustituciones de nucleótidos, por lo que se confirmó la existencia de un gen de lacasa diferente de *cglcc1*, denominado *cglcc1A*.

La multiplicidad de genes que difieren solo en pequeños cambios en sus secuencias de nucleótidos es frecuente en hongos. Sin embargo, la gran similitud entre genes puede estar asociada a la duplicación de genes que llegan a conformar familias, o ser simplemente el resultado de diferencias alélicas. Se han descrito familias de lacasas en diferentes especies de hongos basidiomicetos. También, aunque menos frecuentes, varios trabajos han dado a conocer las secuencias de alelos de estos genes. Casualmente, la primera descripción de genes de lacasa de un basidiomiceto correspondió al aislamiento de los ADNc, y de las secuencias de ADN genómicos que codifican para dos formas alélicas de lacasas de *Coriolus hirsutus* (Kojima y col., 1990). Las secuencias de las regiones codificantes de estos alelos difieren en 18 sustituciones de bases, que resultan en una única sustitución de aminoácidos en las secuencias de las proteínas correspondientes. En *Rhizoctonia solani*, basidiomiceto del cual se han aislado cuatro genes de una familia de lacasas, se han descrito además dos secuencias de ADNc que difieren en relativamente pocas sustituciones de bases respecto a los correspondientes ADN genómicos. Estas sustituciones dan lugar a cambios de 5 y 4 aminoácidos en las secuencias de las proteínas deducidas a partir de los genes *lcc3* y *lcc4*, respectivamente, por lo que los autores proponen que representan formas

alélicas de estos genes (Wahleithner y col., 1996). Zhao y Kwan (1999) han descrito dos secuencias genómicas que constituyen variantes alélicas del gen *lac1* de *Lentinula edodes*. Estos alelos difieren en 45 nucleótidos que resultan en siete aminoácidos diferentes en las proteínas correspondientes. Por último, recientemente González y colaboradores (2003a) demostraron la existencia de un nuevo gen de lacasa en *Trametes* sp. I-62 y discutieron la posibilidad de que constituyera una forma alélica del gen *cglcc1* de esta cepa, basándose fundamentalmente en que las regiones codificantes difieren sólo en nueve sustituciones de bases, localizadas fundamentalmente hacia el extremo 5' del gen, y que resultan en dos cambios en los aminoácidos de las proteínas correspondientes.

Si comparamos las diferencias existentes entre los pares de alelos reportados para las cuatro especies de basidiomicetos anteriores, y las encontradas entre los genes *cglcc1* y *cglcc1A* de *C. gallica*, es posible sugerir que estas secuencias pertenezcan también a formas alélicas de un mismo gen de lacasa.

El trabajo realizado por Calvo (1995) sugirió la existencia de dos genes de lacasa en *C. gallica*, debido a que en los análisis por Southern Blot se detectaron dos bandas en algunas de las digestiones realizadas. Una de estas digestiones, en la que aparecieron estas dos bandas de hibridación con una sonda homóloga, fue la producida por la enzima de restricción *Sac* I. Si se tiene en cuenta que uno de los cambios de nucleótidos que caracteriza a *cglcc1A* es el que implica la pérdida del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sac* I, entonces esa banda adicional observada en la hibridación del Southern Blot, podría corresponder a la hibridación de *cglcc1A*.

Para confirmar de un modo definitivo que los genes *cglcc1A* y *cglcc1* son alelos, sería de gran utilidad realizar estudios de la distribución de los genes en los cromosomas de *C. gallica* mediante electroforesis de campo pulsante, así como obtener micelio monocariótico y estudiar la segregación de los genes en los monocariontes. Esto ayudaría a profundizar en el estudio de las lacasas de este basidiomiceto, que por su gran potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas, resulta muy interesante seguir investigando.

4.6. Expresión heteróloga del gen de lacasa *cglcc1A* de *Coriolopsis gallica* en *Saccharomyces cerevisiae*.

En el presente trabajo se realizó la síntesis del ADNc de un gen de lacasa de *C. gallica*, su clonaje, secuenciación y expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Al secuenciar el ADNc clonado se encontraron diferencias con respecto al gen de lacasa *cglcc1* de *C. gallica*, que han sido discutidas anteriormente, por lo que no haremos referencia a ello en este apartado de la discusión.

Los estudios realizados en medios sólidos confirmaron que las levaduras transformadas producen la lacasa recombinante y la secretan al medio en forma activa, lo que se pudo apreciar por el cambio de color de los distintos sustratos utilizados para detectar la enzima.

Para estudiar la producción de la lacasa recombinante por las levaduras transformadas crecidas en medios líquidos se analizó en primer lugar la expresión del gen mediante RT-PCR. De esta manera se confirmó que su transcripción sólo se produce al añadir galactosa a los medios de cultivo, tal y como había de esperarse al estar clonado bajo un promotor inducible por este azúcar. A continuación se realizaron diferentes pruebas para cuantificar la actividad enzimática. En algunos de los ensayos realizados se consiguió detectar actividad lacasa extracelular. A pesar de que los valores fueron tan bajos que no pudieron ser cuantificados espectrofotométricamente, se evidenció que la proteína activa puede secretarse al medio de cultivo, y que el péptido señal nativo del gen *cglcc1A* se procesa correctamente. Esto se confirmó además en los ensayos realizados con el caldo enzimático libre de células de las levaduras transformadas en los que se produjo la oxidación del ABTS después de 24 horas de ser añadido el sustrato y de su incubación en oscuridad, mientras que en los controles preparados a partir de los caldos de las levaduras no transformadas con el gen *cglcc1A* no se detectó ningún cambio de color de este sustrato. Soden y colaboradores (2002) realizaron el clonaje molecular de un gen de lacasa de *Pleurotus sajor-caju* y su expresión en *Pichia pastoris*. En este estudio observaron que el péptido nativo del gen era más efectivo en la secreción y la maduración de la proteína que el comúnmente usado factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Este último dio lugar a la producción de lacasa activa intracelular, probablemente debida al procesamiento inadecuado de este péptido, según indicaba el color verde oscuro (por oxidación del ABTS) de las colonias transformadas. Otros estudios que comparan la efectividad de los péptidos señal nativos con el factor α de *Saccharomyces cerevisiae* en la secreción de lacasas recombinantes, muestran resultados que difieren. Así, mientras la cantidad de lacasa Lcc1 de *Trametes versicolor* producida en *Pichia pastoris* fue siete veces superior utilizando el péptido señal nativo en comparación con la actividad secretada utilizando el factor α de *S. cerevisiae* (Jönsson y col., 1997), los niveles de producción de la isoforma Lac1 de *Pycnoporus cinnabarinus* en *Pichia pastoris* fueron muy similares en ambos casos (Otterbein y col., 2000). En nuestro estudio no se observó, en ningún caso, que las colonias de levaduras transformadas adquirieran el color verde característico de la oxidación del ABTS sino que esta coloración apareció siempre alrededor de las colonias y difundió en el medio de cultivo por lo que podemos afirmar que el péptido señal nativo del gen *cglcc1A* de *C. gallica* es reconocido y procesado correctamente por la levadura, lo que permite la secreción de la enzima activa al medio extracelular. Un estudio realizado en nuestro laboratorio por Arana, en 2002, mostró que las levaduras *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis* transformadas con el gen de lacasa *cglcc1A* de *C. gallica* producían la proteína heteróloga anclada a sus paredes celulares y no se secretaba al

medio extracelular. La autora concluye que el motivo de que la proteína no fuera secretada correctamente podría deberse a la estructura de la proteína heteróloga y no a la maquinaria de reconocimiento del péptido señal de la levadura. Nuestros resultados indicaron que *Saccharomyces cerevisiae* sí fue capaz de procesar el péptido señal y de secretar correctamente la proteína, de lo que se puede deducir que la especie utilizada como hospedador es un factor importante a tener en cuenta en los estudios de expresión heteróloga de lacasas en levaduras.

Se realizaron estudios adicionales de la actividad lacasa de las levaduras transformantes en medios sólidos con el fin de optimizar las condiciones de cultivo para lograr posteriormente una mayor secreción de la enzima en medios líquidos. El vector de expresión pYES2, posee el promotor pGAL, inducible por galactosa y reprimible por glucosa. Esta característica ofrece la ventaja de que los cultivos de las levaduras transformadas se pueden mantener en un modo de “expresión apagada”, disminuyendo así la selección de células mutantes que no estén expresando la proteína durante la fase de crecimiento celular, como resultado de la carga metabólica agregada en las células o del efecto tóxico potencial producido por la sobreexpresión de la proteína heteróloga. Sin embargo, en nuestro estudio la utilización del vector de expresión pYES2 supuso el inconveniente de que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b transformadas no crecieron bien en los medios que contenían solamente galactosa como fuente de carbono. En los estudios realizados utilizando manosa como fuente de carbono adicional, conjuntamente con galactosa, la actividad lacasa detectada visualmente a través del cambio de color de los medios de cultivo con ABTS fue mucho mayor. Esto puede ser debido al mayor crecimiento de las levaduras transformadas y/o a la mayor secreción de la enzima, ya que se ha descrito que la presencia de manosa en los medios de cultivo facilita la secreción de las proteínas (Goto y col., 1999). Arana (2002), realizó estudios similares con las levaduras *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis* transformadas con el gen *cglcc1A* de *C. gallica*, pero no detectó diferencias en la secreción de la proteína recombinante al añadir manosa al medio de cultivo, en ninguno de los dos casos. Como se mencionó con anterioridad, en ambas levaduras la lacasa quedaba anclada a la pared celular en ambas levaduras, por lo que en este caso la manosa sólo hubiese podido facilitar el crecimiento celular y no la secreción de la lacasa.

Otro de los parámetros que puede influir en la producción de lacasas recombinantes es la concentración final de sulfato de cobre en el medio de cultivo (Cassland y Jönsson, 1999; Gelo-Pujic y col., 1999). Al aumentar la concentración de este compuesto, y del sustrato ABTS, en los medios sólidos se logró detectar visualmente un notable aumento de la actividad lacasa, sin embargo este efecto no se produjo en los cultivos líquidos.

Uno de los factores que influyó notablemente en la cuantificación espectrofotométrica de la actividad enzimática fue el tipo de sustrato utilizado y varios resultados demostraron que el ABTS

no era el más apropiado para medir la producción de las lacasas recombinantes de nuestro estudio. Al medir la actividad lacasa producida por las levaduras transformadas en cultivo líquido de las levaduras transformadas se producía una reacción de reducción del ABTS que alteraba la correcta cuantificación de la actividad enzimática, y que daba lugar a una disminución gradual de la absorbancia, dando valores “negativos” de actividad lacasa. Esto hizo pensar que debía existir, en el medio de cultivo, algún metabolito o enzima producida por la levadura de manera extracelular o anclada a membrana, que estaba interfiriendo en la reacción de la proteína heteróloga con el sustrato, y por lo tanto en la detección de la actividad lacasa. Este mismo efecto de reducción del sustrato ABTS se había observado en medio sólido, donde se veía que el medio de cultivo se hacía gradualmente más claro, incluso blanquecino, en los sectores de la placa donde se inoculaban las levaduras control. Quizás esta reducción del ABTS se produjo también en los otros sectores de las placas inoculados con las levaduras transformadas pero fue enmascarado por la oxidación del ABTS por la lacasa recombinante que coloreó el medio con el verde oscuro característico de esta reacción. En contraste con los sustratos fenólicos que forman las quinonas, el potencial de oxidación del ABTS no es dependiente del pH dentro de un rango comprendido entre 2 y 11 (Hünig y col., 1964), por lo que este efecto no puede ser atribuido al bajo pH de los cultivos de las levaduras transformadas. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que en estas interferencias en la medición estén participando componentes presentes en el medio de cultivo de las levaduras. Johannes y Majcherczyk (2000b) realizaron un estudio para comprobar la eficiencia de diversos compuestos orgánicos descritos como inhibidores de la enzima lacasa. Entre estos compuestos inhibidores se había descrito a la cisteína. Sin embargo, estos autores demostraron que este aminoácido no era tal inhibidor de la actividad enzimática sino que su adición de cisteína a la mezcla de reacción de la enzima con el sustrato resultaba en una decoloración inmediata de la solución, probablemente debida a la reducción del ABTS^{++} a ABTS. No obstante, el cambio de color del ABTS^{++} fue detectado cuando las muestras fueron incubadas durante 30 minutos adicionales, y la cisteína al parecer había sido consumida. Las pruebas realizadas con otros compuestos supuestamente inhibidores de la lacasa corroboraron estos resultados y demostraron que algunos de estos compuestos orgánicos no son tales inhibidores sino que se comportan como reductores de los productos oxidados que son producidos por la acción de la lacasa. El aumento de la absorbancia debido a la oxidación del ABTS por la lacasa, detectado a partir de los 20 minutos desde el inicio de la medición, en los estudios realizados con caldos enzimáticos concentrados de las levaduras transformadas, podría sugerir la existencia de algún compuesto presente en el medio de cultivo, como por ejemplo aminoácidos, que al igual que la cisteína estuviera interfiriendo en la medición, reduciendo los productos de oxidación de la lacasa. Al saturarse este metabolito se lograría la oxidación del ABTS restante. Esto explicaría el retardo en el aumento de la absorbancia debida a la oxidación del ABTS por la lacasa y llamaría la atención sobre el hecho de que entonces los valores de esta actividad enzimática registrados en estas condiciones, están siendo

subestimados. Cuando se utilizó 2,6-dimetoxifenol como sustrato de la lacasa de las levaduras transformadas se consiguió eliminar el efecto de interferencia debido a la reducción del ABTS, pero la medición de la absorbancia no resultó válida para la detección de la actividad lacasa. La razón fue que los valores de actividad que se obtuvieron fueron positivos, tanto en las muestras del cultivo de las levaduras transformadas como en las de los controles. Similares resultados fueron observados por Arana (2002) en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica* transformadas con el gen de lacasa de *C. gallica*. Esta autora plantea que la determinación de la actividad lacasa, con este sustrato puede estar interferida por la adición de CuSO_4 a los medios de cultivo. Este compuesto estuvo presente en todos los ensayos de nuestro estudio. El único sustrato que funcionó adecuadamente en las mediciones de actividad lacasa en todos nuestros análisis fue la siringaldazina. Bulter y colaboradores (2003) también utilizaron este sustrato para la detección de lacasa de un gen de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Saccharomyces cerevisiae* y lo compararon con el ABTS, obteniéndose valores más altos de actividad lacasa con la siringaldazina, lo que confirma que este compuesto pudiera ser un buen sustrato para futuros ensayos de actividad lacasa de este sistema de expresión heterólogo.

La acción de proteasas liberadas por las levaduras al medio de cultivo, que pueden degradar las proteínas expresadas de manera heteróloga (Jönsson y col., 1997; Glover y col., 1997; Flores y col., 1999; Otterbein y col., 2000), fue otro factor analizado para tratar de explicar los bajos niveles de actividad lacasa detectados en los medios líquidos. Diversos estudios realizados con levaduras transformadas con genes de lacasa de diferentes basidiomicetos han descrito que el pH de los medios de cultivo disminuye a 3, aproximadamente, durante el primer día de incubación y que este pH tiene un efecto perjudicial en los niveles de la enzima recombinante (Jönsson y col., 1997; Gelo-Pujic y col., 1999). Este efecto puede ser debido, al menos en parte, a la activación de las proteasas ácidas y a la pérdida de la estabilidad enzimática a estos pH's tan ácidos (Soden y col., 2002). Jönsson y colaboradores (1997), observaron que era importante el uso de un medio de cultivo tamponado a pH 6,0 para poder obtener actividad lacasa en los cultivos líquidos de *Pichia pastoris*, transformada con el gen que codifica para una lacasa de *Trametes versicolor*. Una de las posibles explicaciones es que a pH's más ácido pueden actuar proteasas ácidas destruyendo la proteína recombinante. En nuestros estudios con las levaduras transformadas no se detectó actividad lacasa en las muestras de los cultivos líquidos con medios tamponados a pH 6, ni en aquellos en los que se añadió un preparado de inhibidores de proteasas. Los medios tamponados mantienen solamente el pH en períodos cortos de tiempo y se ha demostrado que son inadecuados a menos que el pH se vaya regulando durante el crecimiento de las levaduras (Jönsson y col., 1997). O'Callaghan y colaboradores, en 2002, describieron el uso de alanina como un componente adicional en el medio de cultivo tamponado que mantiene el pH inicial del medio durante todo el crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* transformada con el gen de lacasa de *Trametes*

versicolor. Estos mismos resultados han sido comprobados por Soden y colaboradores (2002) en los cultivos de *Pichia pastoris* transformada con el gen de lacasa de *Pleurotus sajor-caju*, utilizando medios tamponados suplementados con 0,8% de alanina. Este dato es de gran interés para tener en cuenta en futuros ensayos con nuestras levaduras transformadas.

Se analizó también el efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de la enzima recombinante en cultivos líquidos de *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo en cuenta que se ha comprobado que la producción de enzima activa, debida a la expresión heteróloga de un gen de lacasa de *Trametes versicolor* en esta especie de levadura, depende de la temperatura de cultivo (Cassland y Jönsson, 1999). Estos autores demuestran que la producción de la enzima activa se vio favorecida a temperaturas bajas de incubación, siendo la actividad de 16 veces más alta después de tres días a una temperatura de 19 °C en comparación con la obtenida a 28 °C. En el presente trabajo también se ensayaron dos temperaturas de incubación diferentes: 21 y 30 °C, en los cultivos de las levaduras transformadas. Sin embargo, no se pudo analizar la influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima, ya que en ninguno de los dos casos se detectó actividad lacasa.

Los valores de actividad lacasa detectados en los medios de cultivo de las levaduras transformadas fueron de 0,107 mUA/ml a las 36 horas de incubación. Este nivel de expresión es bajo en comparación con la actividad lacasa alcanzada con *C. gallica*, en otros ensayos de laboratorio. El principal problema de los sistemas de expresión heteróloga de genes de lacasa de hongos basidiomicetos en levaduras es el bajo nivel de producción de las proteínas recombinantes. La mayoría de estos estudios de expresión de los genes de lacasa muestran con éxito la producción de la enzima recombinante tanto en medio sólido como en líquido, sin embargo los niveles de actividad alcanzados en medios líquidos son normalmente bajos. Larsson y colaboradores (2001) describen una actividad de 0,66 mU/ml después de optimizar las condiciones de fermentación. Yasuchi y colaboradores (1990) mostraron una expresión de 5mg/litro de lacasa de *Coriolus hirsutus*. Ninguna de estas lacasas expresadas en *Saccharomyces cerevisiae* fue purificada ni caracterizada. La lacasa de *Trametes versicolor* fue expresada en *Pichia pastoris*, pero ni el nivel de expresión ni la caracterización de la proteína recombinante fue publicado (Jönsson y col., 1997). En otros estudios similares se describen valores de producción de lacasa de *Trametes versicolor* expresada en *Pichia pastoris*, de 11mg de lacasa/litro, pero la actividad específica era extremadamente baja (0,65 U/mg) (Gelo-Pujic y col., 1999) comparado con la misma enzima expresada en la cepa silvestre del hongo (40 U/mg) (Xu y col., 1996). La lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* fue expresada en *Pichia pastoris* con valores de 8 mg/litro. La enzima recombinante no fue aislada ni caracterizada (Otterbein y col., 2000). Uno de los últimos trabajos realizados en expresión de lacasas en levaduras es el publicado por Bulter y colaboradores, en 2003. Estos autores utilizan técnicas de mutagénesis dirigida para aumentar los niveles de actividad de la lacasa

(MtL) de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Saccharomyces cerevisiae*. Con ello se consiguió aumentar 170 veces la actividad de la proteína recombinante en comparación con la producida por la cepa silvestre. La actividad específica de la cepa mutante después de 10 generaciones (35 U/mg medida con siringaldazina) fue comparable a la actividad específica en *Aspergillus oryzae* (36 U/mg). Esta es la más alta actividad lacasa producida por levaduras transformadas descrita hasta el momento en la bibliografía consultada.

Entre los problemas que afectan la producción de proteínas recombinantes por hongos filamentosos y levaduras, en una reciente revisión se señalan, la estabilidad del ARNm, el incorrecto procesamiento del pre-ARNm, las limitaciones a nivel post-translacional, los problemas de translación y translocación, y el control de calidad en el retículo endoplásmico. A los que se pueden oponer algunas soluciones como son el cambiar la secuencia primaria del gen, mejora de la estabilidad de ARNm por fusión con genes altamente expresados y mejoras a nivel post-translacional que pueden apuntar a utilizar genes sintéticos con codones de uso optimizados, fusión de un gen altamente expresado al extremo 5' de un gen heterólogo, sobreproducción de foldasas y/o chaperonas y la utilización de cepas proteasa-deficientes. Este conjunto de medidas pueden contribuir a mejorar la producción y secreción de las proteínas de interés en este caso las enzimas oxidantes producidas por hongos basidiomicetos (Gouka y col. 1997).

En cualquier caso, no hay que descartar la posibilidad de continuar esta investigación utilizando otro tipo de microorganismos hospedadores del gen de lacasa de *C. gallica* tales como los sistemas de expresión en hongos filamentosos. La producción de proteínas fúngicas, tanto homólogas como heterólogas, por hongos filamentosos son normalmente más eficientes que las levaduras y alcanzan niveles de producción de gramos/litro (Gouka y col., 1997). En nuestro caso, decidimos probar con el sistema de expresión en levaduras para responder a algunos intereses de la industria cervecera, en el tratamiento de sus efluentes y el mayor interés radica en que *Saccharomyces cerevisiae* es la especie utilizada en el proceso de fabricación de la cerveza. Yaver y colaboradores, en 1999, expresaron la lacasa de *Coprinus cinereus* en *Aspergillus oryzae* encontrando rendimientos 20 veces más altos en la producción de la proteína recombinante que en la cepa silvestre del hongo basidiomiceto, pudiéndose utilizar en aplicaciones industriales. Con la expresión del gen lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en el deuteromiceto *Aspergillus niger* (Record y col., 2002) se obtuvo el mas alto nivel de actividad descrito hasta el momento (7000 UA/L en el día 10 de incubación). Esta gran producción, junto con el hecho de que no hay hiperglicosilación, hace que este microorganismo transformado sea una buena alternativa para el escalado del proceso.

La expresión del gen *cglc1A* de *C. gallica* en *Saccharomyces cerevisiae*, resulta interesante desde el punto de vista de una posible aplicación biotecnológica. Si bien queda mucho trabajo por realizar, para optimizar tanto los sistemas de detección de la actividad lacasa de la proteína

recombinante, como los sistemas de producción de esta enzima por las levaduras transformadas, puede plantearse la posibilidad de su utilización en el tratamiento de efluentes de la industria cervecera de muy diversas maneras. Una de ellas sería la posibilidad de producir grandes cantidades de la enzima recombinante y, una vez purificada, utilizarla para decolorar el efluente, pues se ha demostrado en el presente trabajo, la importancia de la enzima en los procesos de decoloración. El hecho de que esta enzima no es muy estable en presencia de estos efluentes podría ser resuelto quizás inmovilizándola para eliminar la posible inestabilidad de la proteína debida a su precipitación con los taninos del efluente. Las lacasas pueden ser también utilizadas en la estabilización de la cerveza (Minussi y col., 2002), por lo que puede sugerirse la posibilidad de agregar la enzima durante el proceso de fabricación como ha sido propuesto por Mathiasen (1995). Según este autor una alternativa al tratamiento tradicional, con filtros de PVPP o PVPP insoluble, sería el agregar una lacasa al final del proceso, ya que el oxígeno no es deseado en la cerveza terminada, con lo que la adición de lacasa podría eliminar cualquier exceso de oxígeno, aumentando la vida de almacenamiento de la cerveza, al degradar parte de los polifenoles que puedan permanecer en la misma. Rossi y colaboradores, en 1988 y Giovanelli, en 1989, ya habían planteado el potencial de la utilización de lacasa en la estabilización de la cerveza.

Quizás el mayor interés en cuanto a la realización de la expresión heteróloga de lacasas en *Saccharomyces cerevisiae* radica en que esta es la especie utilizada en el proceso de fabricación de la cerveza. Sería de gran importancia realizar la expresión del gen *cglcc1A* en cepas industriales y estudiar su efecto sobre las características de la cerveza y los efluentes generados. También es necesario valorar la integración de este gen en el genoma de la levadura para garantizar su estabilidad sin necesidad de recurrir a presión selectiva.

Con este trabajo hemos intentado profundizar en algunas de las múltiples posibilidades que pueden surgir al utilizar los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca y/o sus enzimas oxidantes extracelulares en diversas aplicaciones biotecnológicas, como es el caso de la utilización de *Coriolopsis gallica* en el tratamiento del efluente procedente de la industria cervecera. Además, con este estudio se ha llegado a una mejor comprensión de los aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la degradación del efluente por este hongo y a verificar la importancia de la actividad lacasa que parece desempeñar un papel significativo en este proceso.

1. El efluente de la industria cervecera analizado en este trabajo y del que no existen descripciones previas, presenta parámetros contaminantes para el medio ambiente tales como un pH alcalino, un intenso color marrón oscuro, una elevada demanda química de oxígeno y una alta concentración de compuestos polifenólicos, principalmente taninos.
2. El basidiomiceto *Coriolopsis gallica* crece mejor en medios sólidos suplementados con efluente que en los controles, lo que sugiere que los componentes del efluente pueden ser utilizados como nutrientes por el hongo. La decoloración del efluente producida por *C. gallica*, comenzó antes y fue más elevada en comparación con la de otros dos basidiomicetos ensayados, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes* sp. I-62, lo que demuestra su mayor capacidad para degradar este tipo de residuos.
3. El tratamiento del efluente en medios líquidos con *C. gallica* permite disminuir significativamente la demanda química de oxígeno y el color inicial del efluente de la industria cervecera.
4. Concentraciones del 100% de efluente resultan tóxicas para el crecimiento del hongo, que sin embargo toleró porcentajes muy altos de efluente (80%) en medios de cultivo sólidos. En medio líquido, concentraciones de 60% de efluente provocan cierta inhibición del crecimiento de *C. gallica*, al inicio del tratamiento.
5. En las condiciones ensayadas en este estudio, *C. gallica* sólo produjo lacasa, como principal enzima ligninolítica, y no se detectaron ni manganeso ni lignina peroxidasa. Tampoco se observó producción de la enzima tanasa por este hongo.
6. Los niveles de transcritos de lacasa de *C. gallica* están correlacionados significativamente con la actividad de la enzima en los medios de cultivo. La adición de efluente en medio líquido provoca un incremento de la actividad lacasa extracelular y el aumento en los niveles de transcritos del gen de lacasa de *C. gallica*.
7. La decoloración del efluente con *C. gallica* alcanza valores máximos cuando el hongo se cultiva en condiciones desfavorables o estresantes para su crecimiento, como la ausencia de fuente de carbono o la presencia de sorbosa en los medios de cultivo. La decoloración del efluente y el crecimiento del hongo resultan más eficientes en un medio definido (medio Kirk) que en un medio completo (medio 7).

8. Los mejores resultados de decoloración del efluente en medios líquidos están asociados significativamente con los más altos niveles de actividad lacasa detectados en el medio de cultivo. Asimismo es posible obtener decoloración del efluente “*in vitro*” utilizando crudos enzimáticos con alta actividad lacasa en los que no se detecta actividad lignina peroxidasa ni manganeso peroxidasa.
9. El patrón de bandas de los zimogramas de lacasas es muy diferente en los medios con efluente, respecto a los medios control, destacándose los primeros por presentar una mayor intensidad de las bandas y bandas adicionales en diferentes condiciones de cultivo.
10. Se describe la secuencia de un ADN complementario de lacasa de *Corioloropsis gallica* que difiere en nueve sustituciones de bases respecto a la deducida a partir de la región codificante del gen *cglcc1*. La presencia del nuevo gen, denominado *cglcc1A*, se confirmó por PCR-RFLP y se sugiere que los dos genes podrían ser alelos.
11. *Saccharomyces cerevisiae* reconoce y procesa correctamente el péptido señal del gen de lacasa *cglcc1A* y secreta la proteína heteróloga de forma activa al medio extracelular. La expresión de la enzima recombinante en medios sólidos fue máxima en medio mínimo con ABTS (10 mM), CuSO₄ (0,4 mM) y utilizando 75% y 25% de galactosa y manosa conjuntamente como fuentes de carbono. En medios líquidos también se detectó actividad lacasa recombinante utilizando ABTS y siringaldazina como sustratos.

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A y Gübitz GM (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3357-3362.
- Agnan J, Korch C y Selitrennikoff C (1997). Cloning heterologous genes: problems and approaches. *Fungal Genet. Biol.* 21:292-301.
- Akhtar M, Kirk TK y Blanchette RA (1996). Biopulping: An overview of consortia research. Pp.: 187-192. *En: Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, Recent Advances in Applied and Fundamental Research. Srebotnik E y Messner K. (eds.), Facultas-Universitätsverlag, Vienna, Austria.
- Akin DE, Rigsby LL, Sethuraman A, Morrison III WH, Gamble GR y Eriksson K-EL (1995). Alterations in structure, chemistry and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispura* and *Cyathus stercoreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1591-1598.
- Akin DE, Sethuraman A, Morrison III WH, Martin SA y Eriksson KE (1993). Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4272-4282.
- Alexandre G y Zhulin IB (2000). Laccases are widespread in bacteria. *Trend. Biotechnol.* 18:41-42.
- Alexopoulos CJ y Mims CW (eds) (1985). *Introducción a la Micología*, Barcelona. España.
- Almendros G, Dorado J, González-Vila FJ, Martín F (1997). Pyrolysis of carbohydrate-derived macromolecules: its potential in monitoring the carbohydrate signature of geopolymers. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 40-41: 599-610.
- Amer GI y Drew SW (1980). Microbiology of lignin degradation. *En: Annual Report on Fermentation Processes. IV.* Pp:67-103. Tsao, G.T. (ed.), Academic Press, New York.
- Ander P y Eriksson KE (1976). The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109:1-8.
- Ander P, Chitra M, Farrel RL y Eriksson KE (1990). Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose quinone reductase. *J. Biotechnol.* 13:189-198.
- Aramayo R y Timberlake WE (1990). Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. *Nuc. Acids Res.* 18: 3415.
- Arana A (2002). Aplicaciones de la biología molecular: Identificación del basidiomiceto *Trametes* sp. I-62 y expresión heteróloga del gen *cglccl* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. España. 2002.
- Arana-Cuenca A, Roda A, Téllez A, Loera O, Carbajo JM, Terrón MC y González AE (2004). Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. *J. Basic. Microbiol.* 44:79-87.
- Archibald F, Paice MG y Jurasek L (1990). Decolourization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzym. Microb. Technol.* 12:846-853.
- Archibald FS (1993). Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3101-3109.
- Ardon O, Kerem Z y Hadar Y (1996). Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J. Biotechnol.* 51:201-207.
- Ardon O, Kerem Z y Hadar Y (1998). Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Can. J. Microbiol.* 44:676-680.
- Arora DS y Sandhu DK (1984). Laccase production and wood degradation by *Trametes hirsuta*. *Folia Microbiol.* 29: 310-315.
- Arrieta J, Cantera E y Zúñiga I (1998). Depuración de efluentes de cervecería. Aplicación de nuevos procesos anaerobios. *Cerveza y Malta.* XXXVI (2), 138:17-30.
- Arsdell van JN, Kwok S, Schweichart BL, Ladner MB, Gelfand DH e Innis MA (1987). Cloning, characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 5:60-64.
- Asada Y, Kimura Y, Oka A y Kuwahara M (1992). Characterization of a cDNA and gene encoding a lignin peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete, *Bjerkandera adusta*. *En: Biotechnology in Pulp and Paper Industry*, Kuwahara M. y Shimada M. (eds.), Uni Publishers Co., Ltd., Kyoto, Japan.

- Asada Y, Watanabe T, Kimura Y, Irie T, Nakayama M y Kuwahara M (1995). Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1251: 205-209.
- Ashter M, Tonon F, Coirreau G y Odier E (1988). Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Aubert JP, Beguin P y Millet J (eds.) Academic, London, pp. 333-347.
- Aust SD (1990). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb. Ecol.* 20:197-209.
- Baldari C, Murray JA, Ghiara P, Cesareni G, Galeotti CL (1987). A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 beta in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 6:229-234.
- Balice V y Cera O (1984). Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatography method. *Grasas y Aceites.* 35:178-180.
- Bamforth CW (2000). A brief history of beer. *Proceedings of the 26th Conv Inst Brew Asia Pac Sect*, pp. 5-12.
- Bao W, O'Malley DM, Whetten R y Sederoff RR (1993). A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. *Science.* 260:672-674.
- Barbosa AM, Dekker RFM y St. Hardy GE (1996). Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria* sp. when screened on the polymeric dye Poly R-748. *Lett. Appl. Biotechnol.* 23:93-96.
- Bar-Nun N y Mayer AM (1990). Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry.* 29:787-791.
- Bate-Smith EC (1973). Tannins in herbaceous leguminosae. *Phytochemistry.* 12:1809-1812.
- Bellamy L J (1961). The Infrared Spectra of Complex Molecules, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1961.
- Bergbauer M, Eggert C y Kraepelin G (1991). Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 :105-109.
- Bergbauer M y Eggert C (1993). Degradability of chlorine-free bleachery effluent lignins by two fungi: effects on lignin subunit type and on polymer molecular weight. *Can. J. Microbiol.* 40:192-197.
- Berka RM, Schneider P, Golightly E, Brown SH, Madden M, Brown, KM, Halkier T, Mondorf K y Xu F (1997). Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3151-3157.
- Berrocal M, Rodríguez J, Ball AS, Pérez-Leblic MI, y Arias ME (1997). Solubilisation and mineralisation of [¹⁴C] lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyneaus* CECT 3335 during growth in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:379-384.
- Bertrand G (1985). Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR Acad. Sci. (Paris)* 120:266-269.
- Bhat TK, Bhupinder S y Sharma O (1998). *Biodegradation.* 9: 343.
- Bhat TK, Makkar HPS y Singh B (1997). Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Letters Appl. Microbiol.* 25:22-23.
- Birnboim HC y Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bjordan CG, Nilsson T y Daniel G (1999). Microbial decay of waterlogged wood found in Sweden applicable to archaeology and conservation. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 43:63-73.
- Blanchette RA (1991). Delignification by Wood-Decay Fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29:381-398.
- Blanchette RA (1995). Biodeterioration of archaeological wood. *CAB Biodeterioration Abstracts.* 9:113-127.
- Blanchette RA (2000). A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 46:189-204.
- Blanchette RA y Simpson E (1992). Soft rot and wood pseudomorphs in an ancient coffin (700 BC) from Tumulus MM at Gordion Turkey. *International Association of Wood Anatomists Bulletin, NS.* 13:201-213.
- Blanchette RA, Cease KR, Abad AR, Koestler RJ, Simpson E y Sams GK (1991). An evaluation of different forms of deterioration found in archaeological wood. *International Biodeterioration.* 28:3-22.
- Blanchette RA, Nilsson T, Daniel G y Abad A (1990). Biological degradation of wood. *En: Archaeological Wood: Properties, Chemistry and Preservation. Advances in Chemistry Series.* Vol.

- 225, Rowell, R.M. and Barbour, R.J. (eds), American Chemical Society, Washington, DC, pp.141-174.
- Bligny R y Douce R (1983).** Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. *Biochem. J.* 209:489-496.
- Boari G, Brunetti A, Passino R. y Rozzi A (1984).** Anaerobic digestion of olive oil mill wastewater. *Agric. Wastes.* 10:161-175.
- Bollag JM y Leonowicz A (1984).** Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:849-854.
- Bollag JM, Shuttlesworth KL y Anderson DH (1988).** Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3086-3091.
- Boominathan K y Reddy CA (1992).** Fungal degradation of lignin. Biotechnological applications. *En: Handbook of Applied Mycology.* Vol. 4. *Fungal Biotechnology.* pp. 763-822. Arora, DK, Elander, RP y Mukerjee KG (eds.) Marcel Dekker, New York.
- Boominathan K, D'Souza TM, Naidu PS, Dosoretz CG y Reddy CA (1993).** Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3946-3950.
- Borja R, Alba J, Garido SE, Martínez L, García MP, Monteoliva M y Ramos-Cormenzana M (1995).** Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2:233-246.
- Borja R, Martín A, Maestro R, Alba J y Fiestas JA (1992).** Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Process Biochem.* 27:231-237.
- Bourbonnais R y Paice MG (1990).** Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role of laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
- Bourbonnais R y Paice MG (1992).** Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:823-827.
- Bourbonnais R y Paice MG (1996).** Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J.* 79:199-204.
- Bourbonnais R, Paice MG, Leech D y Rochefort D (1998).** Laccase/mediator bleaching of kraft pulps: identification of mediator active species and their role in oxidation of residual lignin subunits. 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver, BC, Canada.
- Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P y Yaguchi M (1995).** Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1876-1880.
- Bradoo S, Gupta R y Saxena RK (1996).** Screening of extracellular tannase-producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42:325-329.
- Brenna O y Bianchi E (1994).** Immobilized laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotechnol. Letters.* 16:35-40.
- Bressler DC, Fedorak PM y Pickard MA (2000).** Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnol. Letters.* 22:1119-1125.
- Broach JR, Jones EW y Pringle JR (1991).** *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Broda P, Birch PRJ, Brooks PR y Sims PFG (1996).** Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Gene families and gene expression for a complex process. *Molecular Microbiology.* 19:923-932.
- Brown MA, Zhao Z y Mauk AG (2002).** Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorg. Chimica Acta.* 331:232-238.
- Buckholz R y Gleeson AG (1991).** Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology.* 9:1067-1072.
- Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C y Arnold FH (2003).** Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:987-995.
- Bumpus JA y Aust SD (1987).** Biodegradation of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)ethane) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2001-2008.
- Burton SG (1994).** Biocatalysis with polyphenoloxidase: a review. *Catal. Today.* 22:459-487.
- Buswell JA y Odier E (1987).** Lignin Biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 6:1-60.
- Cadahía E, Conde E, Fernández de Simón B y García-Vallejo MC (1997).** Tannin composition of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. Part II. *Bark. Holzforchung* 51:125-129.
- Call HP, von Raven A y Leyrer H (1990).** Einsatz von lignolytischen Enzymen bei der Zellstoffun Papierherstellung (Biopulping, Biobleaching). *Papier.* 44:33-41.

- Calvo AM (1995). Decoloración biológica de efluentes alcalinos de la industria papelera mediante tratamiento con hongos ligninolíticos. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.
- Calvo AM, Copa-Patiño JL, Alonso O y González AE (1998). Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch. Microbiol.* 171:31-36.
- Calvo AM, Terrón MC, Fidalgo ML, Pelayo JM, Galletti G y González AE (1995). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry characterization of wheat straw alkaline-cooking effluents after biological treatment with the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Ganoderma australe*. *Analytica Chimica Acta.* 309:145-152.
- Cameron MD, Post ZD, Stahl JD, Haselbach J y Aust SD (2000). Cellobiose dehydrogenase-dependent biodegradation of polyacrylate polymers by *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 7:130-134.
- Capasso R (1997). The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Topics Phytochemistry.* 1:145-156.
- Capasso R, Cristinzio G, Evidente A y Scognamiglio F (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry.* 31:4125-4128.
- Carbajo JM (2001). Estudios fisiológicos y moleculares de inducción de la actividad lacasa por sustancias fenólicas naturales en *Corioloropsis gallica*. Tesina de Licenciatura, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Carbajo JM, Junca H, Terrón MC, Yagüe S, Zapico E y González AE (2002). Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglcc1* in the white-rot fungus *Corioloropsis gallica*. *Can. J. Microbiol.* 48:1041-1047.
- Carnicero A, Trojanowski J, Falcon MA, de la Fuente G, Kharazipour A y Hüttermann A (1992). Lignin degrading capacities of several Fungi imperfecti isolated from soils tested by the radiorespirometric methods. *Microbios.* 72:17-25.
- Cassland P y Jönsson LJ (1999). Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:393-400.
- Cereghino GPL y Cregg JM (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opinion Biotechnol.* 10:422-427.
- Cereghino JL y Cregg JM (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.
- Cerveceros de España (2002). Informe económico 2001. Datos del sector. *Cerveza y Malta.* XXXIX (2), 154:15-24.
- Chagas EP y Durrant LR (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb. Technol.* 29:473-477.
- Chahal DS, Kluepfel D, Morosoli R, Shareck F, Laplante S y Rouleau D (1995). Use of dyes in solid medium for screening ligninolytic activity of selective actinomycetes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52:137-144.
- Chen CL y Chang HM (1985). Chemistry of lignin biodegradation. Pp. 535-555. En: *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Higuchi T (ed). Academic Press. Orlando, Fla.
- Chiavari G y Galletti GC (1992). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of amino acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 24:123-137.
- Childs RE y Bardsley WG (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145:93-103.
- Chivukula M y Renganathan V (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4374-4377.
- Chivukula M, Spadaro JT y Renganathan V (1995). Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* 34:7765-7772.
- Choi G, Larson T y Nuss DL (1992). Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Mol. Plant-Microb. Int.* 5:119-128.
- Chung KT y Cerniglia CE (1992). Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. *Mutat. Res.* 277:201-220.
- Chung KT, Wei CI, y Johnson MG (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends Food Sci. Technol.* 9:168-175.
- Claus H (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179:145-150.
- Claus H y Filip Z (1997). The evidence for a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol. Res.* 152:209-216.

- Clutterbuck AJ (1972). Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 7:423-35.
- Colao MC, Garzillo AM, Buonocore V, Schiesser A y Ruzzi M (2003). Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:153-158.
- Coll PM, Tabernero C, Santamaría R y Pérez P (1993). Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4129-4135.
- Collins PJ y Dobson ADW (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3444-3450.
- Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA y Dobson ADW (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4363-4567.
- Conesa A, Punt PJ y van den Hondel CAMJJ (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.* 93:143-158.
- Corbett NH (1965). Micro-morphological studies on the degradation of lignified cell walls by Ascomycetes and Fungi Imperfecti. *J. Inst. Wood Sci.* 4:18-29.
- Cortacero S, Hernáinz M, Segura A, Cruces C y Fernández A (2003). Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *Trends Anal. Chem.* 22:440-455.
- Cowling EB (1961). Comparative biochemistry of the decay of sweet gum by white-rot fungi. US Department of Agriculture Technical Bulletin 1258, pp 79.
- CPPA (1974). Technical Section Standard Method H5P, Canadian Pulp and Paper Association: Montreal, Canada.
- Crawford DL y Crawford RL (1980). Microbial degradation of lignin. *Enz. Microb. Technol.* 2:11-21.
- Crawford DL y Sutherland JB (1979). The role of actinomycetes in the decomposition of the lignocellulose. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:143-151.
- Crawford RL (1981). Lignin biodegradation and transformation. John Wiley & Son, New York.
- Crecchio C, Ruggiero P y Pizzigallo MDR (1995). Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotech. Bioeng.* 48:585-591.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J y Higgins DR (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16:23-52.
- Crous E (1994). Medio ambiente e industria cervecera. *Cerveza y Malta XXXI* (1), 121:15-36.
- Cullen D (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* 53:273-289.
- Da Silva NA y Bailey JE (1991). Influence of dilution rate and induction of cloned gene expression in continuous fermentations of recombinant yeast. *Biotech. Bioeng.* 37:309-317.
- Daniel GF y Nilsson T (1998). Developments in the study of soft rot and bacterial decay. *En: Forest Products Biotechnology*. Bruce, A. and Palfreyman, J.W. (eds), Taylor and Francis, London. p. 326.
- Daniel GF, Nilsson T y Singh AP (1987). Degradation of lignocelluloses by unique tunnel-forming bacteria. *Can. J. Microbiol.* 33:943-948.
- D'Annibale A, Crestini C, Vinciguerra V y Sermanni GG (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotechnol.* 61:209-218.
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V y Sermanni GG (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* 77:265-273.
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Di Mattia E y Giovannozzi Sermanni G (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinus edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Proc. Biochem.* 34:697-706.
- De Nobel JG y Barnett JA (1981). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* 7:313-323.
- Dec J y Bollag JM (2000). Phenoloxidase-mediated interaction of phenols and anilines with humic materials. *J. Environ. Qual.* 29:665-676.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G y Le Petit J (2000). Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:925-929.
- Devchand M y Gwynne DI (1991). Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. *J. Biotechnol.* 17:3-9.
- Devereux J, Haerberli P y Smithies O (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic. Acids Res.* 12: 387-395.

- Diamantidis G, Effosse A, Potier P y Bally R (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* 32:919-927.
- Dias AA, Bezerra RM y Pereira AN (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Biores. Technol.* 92:7-13.
- Dijk van R, Faber KN, Kiel JAKW, Veenhuis M y Klei van der I (2000). The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzym. Microb. Technol.* 26: 793-800.
- Dipple A, Cheng SC y Bigger CAH (1990). En: Mutagens and carcinogens in the diet. MW Pariza, HV Aeschbacher, JS Felton, and S Sato (ed), Wiley-Liss, New York.
- Dosoretz CG, Chen A, HC y Grethlein HE (1990). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:131-137.
- Dosoretz CG, Rothschild N y Hadar Y (1993). Overproduction of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* (BKM.F-1767) under nonlimiting nutrient conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1919-1926.
- Drew SW y Kadam KL (1979). Lignin metabolism by *Aspergillus fumigatus* and white-rot fungi. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:152-161.
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Ostergaard P, Schneider P, Svendsen A y Davies GJ (2001). The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallogr.* D57:333-336.
- Durán N y Esposito E (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. Environ.* 28:83-99.
- Durán N, Rosa MA, D'Annibale A y Gianfreda L (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enz. Microb. Technol.* 31:907-931.
- Eastmond R (1974). *J. Instit. Brewing.* 80; 188.
- Eaton DC, Chang HM y Kirk TK (1980). Decolorization of kraft bleach plant effluents. *Tappi J.* 63:103-106.
- Eckart MR y Bussineau CM (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:525-30.
- Eggert C, Temp U, Dean JF y Eriksson KE (1996a). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391:144-148.
- Eggert C, Temp U y Eriksson KE (1996b). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1151-8.
- Eggert C, Temp U y Eriksson KE (1997). Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett.* 407: 89-92.
- Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-EL y Dean JFD (1998). Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1766-1772.
- Eichlerova I y Homolka L (1999). Preparation and crossing of basidiospore derived monokaryons, a useful tool for obtaining laccase and other ligninolytic enzyme higher producing dikaryotic strains of *Pleurotus ostreatus*. *A. Leeuwenh.* 75:321-327.
- Elble R (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques.* 13:18-22.
- Eriksson KE (1989). A biotechnological approach to pulp bleaching. Pp. 101-109. En: Enzyme systems for lignocellulose degradation. Couhglan MO. (ed.). Elsevier Appl. Sci., London
- Eriksson KE, Blanchette RA y Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Timell, TE (ed.) Springer-Verlag, Berlin.
- Evans BR, Dutton MV, Guillén F y Veness RG (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:235-240.
- Evans CS (1985). Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor*: in vivo and in vitro studies. *FEMS Microbiol. Letters.* 27:339-343.
- Fabbri D, Mongardi M, Montanari L, Galletti GC, Chiavari G y Scotti R (1998). Comparison between CP/MAS ¹³C-NMR and pyrolysis-GC/MS in the structural characterization of humins and humic acids of soil and sediments. *Fresenius J. Anal. Chem.* 362: 299-306.
- Fåhræus G, Lindeberg G (1953). Influence of tyrosine and some other substances on the laccase formation in *Polyporus* species. *Physiol. Plant.* 6:150-158.
- Fåhræus G y Reinhammar B (1967). Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Poliporus versicolor* and some properties of laccase. *Acta Chem. Scand.* 21:2367-2378.
- Falcón MA, Rodríguez A, Carnicero A, Regalado V, Perestelo F, Milstein O y De la Fuente G (1995). Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife island. *Soil Biol. Biochem.* 27:121-126.

- Fantozzi P, Montanari L, Mancini F, Gasbarrini A, Addolorato G, Simoncini M, Nardini M, Ghiselli A y Scaccini C (1998). In vitro antioxidant capacity from wort to beer. *Technology*. 31:221-227.
- Farnet AM, Tagger S y Le Petit J (1999). Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *C. R. Acad. Sci. Ser. III*. 322:499-503.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A y Sampaio JP (2001). Basidiomycetous yeasts. *En: The Mycota VII Part B Systematics and Evolution*, D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin and P.A. Lemke (eds.), Springer-Verlag, Berlin (2001), pp. 3-35.
- Fernández-Larrea JB y Stahl U (1996). Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 539-551.
- Fidalgo ML, Terrón MC, Martínez AT, González AE, González-Vila FJ y Galletti G (1993). Study of fractions from alkaline extraction of wheat straw through chemical degradation, analytical pyrolysis, and spectroscopic techniques. *J. Agric. Food Chem.* 41:1621-1626.
- Field JA, de Jong E, Costa GF y de Bont JA (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2219-2226.
- Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G y Bont JA (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:44-49.
- Fiestas JA, Navarro R, Leon R, García AJ y Mastrojuan JM (1982). Depuración anaerobia del alpechín como fuente de energía. *Grasas y Aceites*. 33:265-270.
- Fincham JRS (1989). Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* 3:148-170.
- Flores MV, Cuellas A y Vogert CE (1999). The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 15:1437-1348.
- Gaillardin C y Heslot H (1988). Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic. Microbiol.* 28:161-174.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK., Strauss J y Haltrich D (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*. 148:2159-2169.
- Galletti GC, Modafferi V, Poiana M y Bocchini P (1995). Analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis-methylation of wine tannin. *J. Agric. Food Chem.* 43:1859-1863.
- Galletti GC, Reeves JB (1992). Pyrolysis/gas chromatography/ion-trap detection of polyphenols (vegetable tannins): Preliminary results. *Org. Mass Spectrom.* 27: 226-230.
- Galliano H, Gas G, Seris JL y Boudet AM (1991). Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13:478-482.
- Gardner RJ, McGuinness JD (1977). Technical quarterly of the master brewers association of the americas. 14:250.
- Garg SK y Modi DR (1999). Decolorization of pulp-paper mill effluents by White-Rot Fungi. *Critical Rev. Biotechnol.* 19:85-112.
- Gaskell J, Steward P, Kersten P, Covert S, Reiser J y Cullen D (1994). Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: Application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio/Technology*. 12:1372-1375.
- Gellissen G (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:741-50.
- Gellissen G y Hollenberg CP (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*: a review. *Gene*. 190:87-97.
- Gellissen G, Janowicz ZA, Merckelbach A, Piontek M, Keup P, Weydemann U, Hollenberg CP y Strasser AWM (1991). Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: efficient secretion of glucoamylase. *Bio/Technology*. 9:291-295.
- Gelo-Pujic M, Kim HH, Butlin NG y Palmore GTR (1999). Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5515-5521.
- Germann UA y Lerch K (1986). Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: Amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 8854-8858.
- Germann UA, Muller G, Hunziker PE y Lerch K (1988). Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J. Biol. Chem.* 263:885-896.
- Gettemy JM, Ma B, Alic M y Gold MH (1998). Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:569-574.

- Gianfreda L, Xu F y Bollag JM (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 3:1-25.
- Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G y Sannia G (1995). Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2408-2413.
- Giardina P, Aurelia V, Cannio R, Marzullo L, Amoresano A y Siciliano R (1996). The gene, protein and glycan structure of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* 235:508-515.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* 341: 655-663.
- Giga-Hama Y y Kumagai H (1999). Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:235-44.
- Gigi O, Marbach J y Mayer AM (1980). Induction of laccase formation in *Botrytis*. *Phytochemistry.* 19:2273-2275.
- Gil AL (1995). Aspectos técnicos del tratamiento de efluentes. S. A. El Águila. *Cerveza y Malta.* XXXII (2), 126:16-25.
- Giovanelli G (1989). Enzymic treatment of malt polyphenols for beer stabilization. *Industria delle Bevande.* 18:497-502.
- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML y Bally R (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:205-210.
- Glenn JK y Gold MH (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1741-1747.
- Glenn JK y Gold MH (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:329-341.
- Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M y Gold MH (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 1077-1083.
- Glover DJ, McEwen RK, Thomas CR y Young TW (1997). pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology.* 143:3045-3054.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H y Oliver SG (1996). Life with 600 genes. *Science* 274:546-567.
- Gold MH, Glenn JK y Alic M (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol.* 161:74-78.
- Gold MH, Brown BJ, Godfrey MB, Mayfield H, Wariishi H y Valli K (1991). Structure and regulation of a manganese peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS. Symp. Ser.* 460:188-199.
- Gold MH y Alic M (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605-622.
- Gómez-Pardo E y Peñalva MA (1990). The upstream region of the IPNS gene determines expression during secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 89: 109-115.
- González A, Griva E y Grinbergs J (1986). Biologische Umwandlung von Holz in Rinderfutter-“Palo podrido”. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141:181-186.
- González T (2001). Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes* sp. I-62. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.
- González T, Terrón MC, Yagüe S, Zapico E, Galleti GC y González AE (2000). Fungal biotreatment of a Cuban distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 CECT 20197 monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14:1417-1424.
- González T, Terrón MC, Zapico E, Yagüe S, Téllez A, Junca H y González AE (2003a). Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by cDNA sequences of *Trametes* sp. I-62 laccase family. *Mycol. Res.* 107:727-735.
- González T, Terrón MC, Zapico EJ, Téllez A, Yagüe S, Carbajo JM y González AE (2003b). Use of multiplex reverse transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7083-7090.
- Goto M, Tsukamoto M, Kwon I, Ekino K y Furukawa K (1999). Functional analysis of O-linked oligosaccharides in threonine/serine-rich region of *Aspergillus* glucoamylase by expression in mannosyltransferase disruptant of yeast. *Eur. J. Biochem.* 260:596-602.

- Gouka RJ, Punt PJ y van den Hondel CA (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:1-11.
- Gouka RJ, van der Heiden M, Swarthoff T y Verrips T (2001). Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2610-2616.
- Greco G, Toscano JG, Cioffi M, Gianfreda L y Sannino F (1999). Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water Res.* 33:3046-3050.
- Gregory RP y Bendall DS (1996). The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem. J.* 101:569-581.
- Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ (1990). Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 465-469.
- Hagerman AE y Butler LG (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256:4494-4497.
- Hamdi M, Kadir A y García JL (1991). The use of *Aspergillus niger* for bioconversion of olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:829-831.
- Hammel KE, Tardone PT, Moen MA y Price LA (1989). Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn(III): New observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. *Arch. Biochem. Biophys.* 270:404-409.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:577-580.
- Harkin JH y Obst JR (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia.* 37:381-387.
- Harris G (1956). *J. Instit. Brewing.* 62; 390.
- Harris G (1965). *J. Instit. Brewing.* 71; 292.
- Harvey BM y Walker JRK (1999). Studies with plant laccases: I. Comparison of plant and fungal laccases. *Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 3:45-51.
- Haslam E (1989). *Plant Polyphenols*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Hatakka A (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi; production and role in lignin biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:125-135.
- Hatakka AI, Mohammandi OK y Lundell TK (1989). The potential of white-rot fungi and their enzymes in the treatment of lignocellulosic feed. *Food Biotechnol.* 3:45-48.
- Hatamoto O, Sekine H, Nakano E y Abe K (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:58-64.
- Have ten R y Teunissen PJ (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101:3397-3413.
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M y Szewzyk U (1998a). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2788-2793.
- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer H, Szewzyk U y Martínez AT (1998b). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428:141-146.
- Heinisch JJ y Hollenberg CP (1993). Yeasts. En: *Biotechnology*, 2nd ed. Rehm H J y Reed G (eds.) Verlag VCH, Weinheim, pp. 469-514.
- Hensing MC, Rouwenhorst RJ, Heijnen JJ, van Dijken JP y Pronk JT (1995). Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *A. Leeuwenh.* 67(3):261-79.
- Hermann TE, Kurtz MB y Champe SP (1983). Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 154:955-964.
- Hernández-Coronado MJ, Hernández M, Centenera F, Pérez MI, Ball AS, y Arias ME (1997). Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strain grown in solid state fermentation. *Microbiology.* 143:1359-1367.
- Higuchi T (1989). Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. En: *Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation*, vol. 399, Lewis NG, Paice MG (eds.), ACS Symposium Series; pp. 482-502.
- Higuchi T (1990). Lignin biochemistry, biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
- Hitzeman RA, Hagie FE, Levine HL, Goeddel DV, Ammerer G y Hall BD (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature.* 293:717-722.
- Hofer C y Schlosser D (1999). Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett.* 451:186-90.
- Hoffman CS y Wriston F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57:267-272.

- Hoffmeyer P (1976). Mechanical properties of soft-rot-decayed Scots pine with special reference to wooden poles. *En: Soft-Rot in Utility Poles Salt-Treated in the Years 1940-1954*. Swedish Wood Preservation Institute, Number 117, Stockholm, pp. 2.1-2.55.
- Hofrichter M (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enz. Microb. Technol.* 30:454-466.
- Hofrichter M y Fritsche W (1997). Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzymes systems -II- The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:419-424.
- Holland PL y Tolman WB (2000). A structural model of the Type 1 copper protein active site: N₂S (thiolate)-S-(thioether) ligation in a Cu(II) complex. *J. Am. Chem. Soc.* 122:6331-6332.
- Hollenberg CP y Gellissen G (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(5):554-60.
- Hopkins TL y Kramer KJ (1992). Insect cuticle sclerotization. *Ann. Rev. Entomol.* 37:273-302.
- Horvath PJ (1981). The nutritional and ecological significance of *Acer*-tannins and related polyphenols. M.S.Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.
- Hoshida H, Nakao M, Kanazawa H, Kubo K, Hakukawa T, Morimasa K, Akada R y Nishizawa Y (2001). Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *J. Biosci. Bioeng.* 92:372-380.
- Hough JS (1990). *Biotechnología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia.
- Howard GA (1980). The institute of brewing (Australia & New Zealand Section). Proceeding of the 16th Convention, 1980, 177.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A y Martin-Verstraete I (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* 183:5426-5430.
- Hünig S, Balli H, Conrad H y Schott A (1964). Ber zweistufige Redoxsysteme, III. Polarographie von 2,2'-Azinen aromatischer Heterocyclen. *Liebigs Ann. Chem.* 676:52-65.
- Husain Q y Jan U (2000). Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenoloxidases. *J. Sci. Ind. Res.* 59:286-293.
- Hüttermann A, Mai C y Kharazipour A (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:387-394.
- Iconomou D, Diamantidis G, Zanganas P, Theohari I, Israilides K y Kouloumbis P (2000). Reduction of phenolic concentration in olive-oil mill wastewater by biotechnological means. *En: V.A. Tsihrantzis, G.P. Korfiatis, K.L. Katsifarakis and A.C. Demetracopoulos, (eds.), Proceedings of International Conference on "Protection & Restoration of the Environment V", Thassos, Greece. Bouris, Thessaloniki, Greece vol. I, pp. 569-572.*
- IDAE informes (1997). Indicadores energéticos, Sector de Fabricación de Cerveza (1997). IDAE, MINER.
- Iibuchi S, Minoda Y y Yamada K (1968). Studies on tannin acyl hydrolase of microorganism. III. Purification of the enzyme and some properties of it. *Agric. Biol. Chem.* 32:803-809.
- Iimura Y, Takenouchi K, Nakamura M, Katayama S y Morohoshi N (1992). Cloning and sequence analysis of laccase genes an its use for an expression vector in *Coriolus versicolor*. *En: Biotechnology in pulp and paper industry*, Kuwahara, M. and Shimada, M. (eds.) pp. 427-431. Uni Publishers, Tokyo, Japan.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K y Kimura A (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168
- Jaouani A, Sayadi S, Vanthournhout M y Penninckx MJ (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enz. Microb. Technol.* 33:802-809.
- Jarosz-Wilkolazka A, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W y Leonowicz A (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enz. Microb. Technol.* 30:566-572.
- Jeenes DJ, Mackenzie DA, Roberts IN y Archer DB (1991). Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9:327-367.
- Jennings DH y Bravery AF (1991). *Serpula lacrymans: Fundamental Biology and Control Strategies*. Wiley, New York, pp. 217
- Jerumanis J (1985). Quantitative analysis of flavonoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Instit. Brewing.* 91:250-252.
- Johannes C y Majcherczyk A (2000a). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediators systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:524-528.
- Johannes C y Majcherczyk A (2000b). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* 78:193-199.

- Johannes C, Majcherczyk A y Hütterman A (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:313-317.
- Johansson T y Nyman PO (1996). A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene*. 170:31-38.
- Jönsson L, Becker H y Nyman P (1994). A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1207:255-259.
- Jönsson L, Sjöström K, Häggström I y Nyman PO (1995). Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1251:210-215.
- Jönsson LJ, Saloheimo M y Penttilä M (1997). Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* 32:425-430.
- Kahraman S y Yesilada O (1999). Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi. *Folia Microbiol.* 44:673-676.
- Kahraman S y Yesilada O (2001). Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. *Folia Microbiol.* 46:133-136.
- Karahanian E, Corsini G, Lobos S y Vicuña R (1998). Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1443:65-74.
- Karam J y Nicell JA (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:141-153.
- Kawai S, Umezawa T y Higuchi T (1988). Degradation mechanisms of phenolic- β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.* 262:99-110.
- Kersten PJ (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:2936-2940.
- Kersten PJ y Kirk TK (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169:2195-2201.
- Kersten PJ, Kalyanaraman B, Hammel KE, Reinhammar B y Kirk TK (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* 268:475-480.
- Keyser P, Kirk TK y Zeikus JG (1978). Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* 135: 790-797.
- Kierulff JV y Pedersen AH (1996). Providing a bleached look to dyed fabric, e.g., denim, by contact with an aq. phenol oxidising enzyme system and an enhancing agent, e.g. a syringate. *International Patent Application* WO96/12845
- Kiiskinen L y Saloheimo M (2004). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the Ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:137-144.
- Kim S, Leem Y, Kim K y Choi HT (2001). Cloning of an acidic laccase gene (*cla2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:151-156.
- Kirby W, Williams PM, Wheeler RE y Jones M (1977). European Brewery Convention. Proceeding of the 16th Congress, Amsterdam, 1977, 415.
- Kirby N, McMullan G y Marchant R (1995). Decolourisation of artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Lett.* 17:761-764.
- Kirby N, Marchant R y McMullan G (2000). Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:93-96.
- Kirk TK (1971). Effect of microorganism on lignin. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:185-210.
- Kirk TK (1975). Effects of a brown-rot fungus *Lenzites trabea* on lignin in spruce wood. *Holzforschung*. 29:99-107.
- Kirk TK (1987). Lignin-degrading enzymes. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*. 321:461-474.
- Kirk TK y Alder E (1969). Catechol moieties in enzymatically liberated lignin. *Acta. Chem. Scand.* 23: 705-707.
- Kirk TK y Farrell R. (1987). Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- Kirk TK y Shimada M (1985). Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *En: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Higuchi, T. (ed.), Uni. Tokyo pp. 579-605.
- Kirk TK, Croan S, Tien M, Murtagh KE y Farrell RL (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enz. Microbiol. Technol.* 8:27-32.
- Kissi M, Mountadar M, Assobhei O, Gargiulo E, Palmieri G, Giardina P y Sannia G (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:221-226.

- Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Le Petit J, Giorgi M y Tron T (2002). Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *Eur. J. Biochem.* 269:6119-6125.
- Kojima Y, Tsukuda Y, Kawai Y, Tsukamoto A, Sugiura J, Sakaino M y Kita Y (1990). Cloning, sequencing analysis and expression of lignolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* 265:15224-15230.
- Koroljova-Skorobogat'ko O, Steporova E, Garrilova V, Morozova O, Lubimova N, Dzchaforova A, Jaropolov A y Makower A (1998). Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:47-54.
- Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jing H, Zhu YC, Xu R, Kerwin JL y Turecek F (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* 57:385-392.
- Kruszewska JS (1999). Heterologous expression of genes in filamentous fungi. *Acta Biochim. Pol.* 46:181-95.
- Kurek B y Kersten P (1995). Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. *Enz. Microb. Technol.* 17:751-756.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA y Gold MH (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lamar RT, Schoenike B, Vanden Wymelenberg A, Stewart P, Dietrich DM y Cullen D (1995). Quantitation of fungal mRNAs in complex substrates by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium* colonized soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2122-2126.
- Larrondo LF, Avila M, Salas L, Cullen D y Vicuña R (2003). Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology.* 149:1177-1182.
- Larsson S, Cassland P y Jönsson LJ (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1163-1170.
- Latte KP y Kolodziej H (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Z. Naturforsch [C].* 55:467-472.
- Laws DRJ, McGuinness JD y Bath NA (1976). *J. Am. Societ. Brewing Chemist.* 34:170.
- Leathman GF y Stahmann MA (1981). Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125:147-157.
- Lee IY, Jung KH, Lee CH y Park YH (1999). Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 21:965-968.
- Leisola MSA, Kozulic B, Meussdoerffer F y Fiechter A (1987). Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 262:419-424.
- Lemontt JF, Wei CM y Dackowski WR (1985). Expression of active human uterine tissue plasminogen activator in yeast. *DNA.* 4:419-428.
- Leonowicz A y Trojanowski J (1975). Induction of laccase by ferulic acid in basidiomycetes. *Acta Biochim. Pol.* 22:291-295.
- Leonowicz A, Trojanowski J y Barbara O (1979). Basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of laccase with phenolic substrates. *Acta Biochim. Pol.* 25:369-378.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Nam-Seok CH y Hofrichter M (1999). Biodegradation of lignin by White Rot Fungi. *Fung. Genet. Biol.* 27:175-185.
- Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M y Matuszewska A (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microbiol.* 41:185-227.
- Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Pozdnyakova NN, Vares T, Kalkkinen N, Hatakka AI y Golovleva LA (1999). Reactions of blue and yellow fungal laccases with lignin model compounds. *Biochemistry-Moscow.* 64:1150-1156.
- Litvintseva AP y Henson JM (2002a). Characterization of two laccase genes of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and their differential transcription in melanin mutants and wild type. *Mycol. Res.* 106:808-814.
- Litvintseva AP y Henson JM (2002b). Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1305-1311.
- Liu W, Chao Y, Liu S, Bao H y Qian S (2003). Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:174-181.

- Lobos S, Larrondo L, Salas E, Karahanian y Vicuña R (1998). Cloning and molecular analysis of a cDNA and *Cs-mnp1* gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Gene*. 206: 185-193.
- Lorenzo M, Moldes D, Couto SR y Sanroman A (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Biores. Technol.* 82:109-113.
- Maestro-Durán R, Borja-Padilla R, Luque-González M y Martín-Martín A (1993). Compuestos fenólicos en las aguas residuales de destilerías vinicas (vinazas). *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35:517-528.
- Maillard MN, Soum MH, Boivin P y Berset C (1996). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *Technology*. 29:238-244.
- Makkar HPS y Goodchild AV (1996). Quantification of tannins: A laboratory manual. 2nd Edition. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria. pp.25.
- Makkar HPS, Blümmel M, Borowy NK y Becker K (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61:161-165.
- Maltseva OV, Niku-Paavola ML, Leontievsky AA, Myasoedova NM y Golovleva LA (1991). Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13:291-302.
- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea JB, Brizuela MA y González AE (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2637-2646.
- Mansur M (1996). Caracterización bioquímica y molecular de las fenoloxidasas de hongos ligninolíticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Mansur M, Suárez T y González AE (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl. Environ. Microbiol.* 64:771-774.
- Mansur M, Flärdh M, Arias ME, Copa-Patiño JL y González AE (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*. 95:1013-1020.
- Martin A, Borja R, García I y Fiestas JA (1991). Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Proc. Biochem.* 26:101-107.
- Martín F, Sáiz-Jiménez C y González-Vila FJ (1979). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of lignins. *Holzforschung*. 33:210-212.
- Martínez J, Pérez J, Moreno E y Ramos-Cormenzana A (1986). Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechín en su posible aprovechamiento. *Grasas y Aceites*. 37:215-223.
- Martínez-Nieto L, Ramos-Cormenzana A, García-Pareja P y Garrido-Hoyos SE (1992). Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*. *Grasas y Aceites*. 43:75-81.
- Martins LO, Soares C, Pereira M, Teixeira M, Costa T, Jones GH y Henriques AO (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277:18849-18859.
- Martirani L, Giardina P, Marzullo L y Sannia G (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Wat. Res.* 30:1914-1918.
- Mathiasen T.E. (1995). *Laccase and beer storage*. PCT Int. Appl. WO 9521240 A2.
- Mayer AM y Harel E (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. 18:193-215.
- Mayer AM y Staples RC (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60:551-565.
- McElroy D y Jacobsen J (1995). What's brewing in barley biotechnology. *Biotechnology*. 13; 245-249.
- McGuirl MA y Dooley DM (1999). Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:138-144.
- McMillin DR y Eggleston MK (1997). Bioinorganic chemistry of laccase. En: Multicopper oxidases. Messersschmidt A (ed.), Singapore: World Scientific; pp. 129-166.
- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T y Nigam P (2001). Mini-review: microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:81-87.
- McMurrrough I (1981). High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops. *J. Chromatog.* 218:683-693.
- McMurrrough I, Madigan D, Kelly R y O'Rourke T (1999). Haze formation. Shelf-life prediction for lager beer. *Food Technology*. 53:58-62.
- McMurrrough I, Hennigan GP y Loughrey MJ (1983). Content of simple, polymeric and complexed flavanols in worts and beers and their relationship to haze formation. *J. Instit. Brewing*. 89:15-23.
- Mendoza-Vega O, Sabatie J y Brown SW (1994). Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:369-410.

- Messerschmidt A y Huber R (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187:341-352.
- Messerschmidt A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Avigliano L, Petruzzelli R, Rossi A y Finazzi-Agro A (1992). Refined cristal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224:179-205.
- Messner K y colaboradores (2000). Resumen final proyecto OXEPI, UE. Datos no publicados.
- Messner K y Srebotnik E (1994). Biopulping: an overview of developments and environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:351-364.
- Mester T y Field JA (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273:15412-15417.
- Mikuni J y Morohoshi N (1997). Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:79-84.
- Minussi R C, Pereira DG, Pastore GM y Durán N (1998). Enzymatic oxidation of ferulic acid by laccase. En: *IV National Congress of Biotechnology*, Talca-Chile, R-58, pp. 60.
- Minussi RC, Pastore GM y Durán N (1999). Enzima de interés en enología: lacasa. *Alimentaria.* 304:145-150.
- Minussi RC, Pastore GM y Durán N (2002). Potential applications of laccase in the food industry: Review. *Trend Food Sci. Technol.* 13:205-216.
- Moir DT y Dumanis DR (1987). Glycosylation and secretion of human alpha-1-antitrypsin by yeast. *Gene.* 56:209-217.
- Moore D (1981). Effects of hexose analogues on Fungi: Mechanisms of inhibition and of resistance. *New Phytol.* 87:487-515.
- Morgan P, Lewis ST y Watkinson RJ (1991). Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:693-696.
- Morrison III WH y Mulder MM (1994). Pyrolysis mass spectrometry and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of ester- and ether-linked phenolic acids in coastal bermudagrass cell walls. *Phytochemistry.* 35:1143-1151.
- Mulkay P, Touillaux R y Jerumanis J (1981). Proanthocyanidins of barley: separation and identification. *J. Chromatog.* 208:419-423.
- Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P y Dalbøge H (1998). Comparison of expression systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14:1267-1283.
- Mumberg D, Muller R y Funk M (1994). Regulable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl. Acid Res.* 22:5767-5768.
- Naidu PS, Zhang YZ y Reddy CA (1990a). Nucleotide sequence of a new lignin peroxidase gene GLG3 from the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Nucl. Acid Res.* 18:7173.
- Naidu PS, Zhang ZY y Reddy AC (1990b). Characterization of a new lignin peroxidase gene (GLG6) from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:994-1000.
- Nakanishi K (1962). *Infrared Absorption spectroscopy-Practical*, Holden-Day, Inc., San Francisco.
- Nielsen H y Krogh A (1998). Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. En: *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S y Heijne von G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Eng.* 10:1-6.
- Niku-Paavola ML, Karhunen E, Salola P y Raunio V (1988). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* 254:877-84.
- Nordkvist E, Salomonsson AN y Aman P (1984). Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J. Sci. Food Agric.* 35:657-661.
- O'Callaghan J, O'Brien M, McClean K y Dobson ADW (2002). Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:55-59.
- Oeveren van PW (1993). An Internacional Perspective. Heineken Technical Services. Symposium Water and Effluent in the Brewing and Malting Industries: Legislation, Economics and Practice. BRF International, Nutfield, Surrey (UK).
- Oh HI, Hoff JE, Armstrong GS y Haff LA (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.* 28:394
- Okamoto K, Ito Y, Shigematsu I, Yanagi SO y Yanase H (2003). Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience.* 44:11-17.

- Ong E, Pollock WBR y Smith M (1997). Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene*. 196:113-119.
- Otero RC y Gaillardin C (1996). Dominant mutations affecting expression of pH-regulated genes in *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* 252:311-319.
- Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M y Moukha S (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 267:1619-1625.
- Pahl HL y Baeuerle PA (1994). Oxygen and the control of gene expression. *BioEssays*. 16:497-502.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:920-924.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G (1997). A Novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272:31303-31307.
- Parekh RN y Wittrup KD (1997). Expression level tuning for optimal heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 13:117-122.
- Parekh RN, Forrester K y Wittrup KD (1995). Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expr. Purif.* 6:537-545.
- Pasti MB y Crawford DL (1991). Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose. *Can. J. Microbiol.* 37:902-907.
- Pasti MB, Hagen SR, Korus RA y Crawford DL (1991). The effects of various nutrients on extracellular peroxidases and acid-precipitable polymeric lignin production by *Streptomyces chromofuscus* A2 and *Streptomyces viridosporus* T7A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:661-667.
- Pasti-Grigsby MB, Paszczynski A, Goszczynski S, Crawford DL y Crawford RL (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3605-13.
- Patel RN, Thakker GD y Rao KK (1994). Potential use of a white-rot fungus *Antrodia sp.* RK1 for biopulping. *J. Biotechnol.* 36:19-23.
- Pease EA y Tien M (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174:3532-3540.
- Peredes MJ, Monteoliva-Sánchez M, Moreno E, Pérez J, Ramos-Cormenzana A y Martínez J (1986). Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere*. 15:659-664.
- Pérez J, de la Rubia T, Hamman OB y Martínez J (1998). *Phanerochaete flavidio-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2726-2729.
- Pérez J, de la Rubia T, Moreno J y Martínez J (1992). Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:489-495.
- Périer FH y Gold MH (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2240-2245.
- Perry CR, Smith M, Britnell CH, Wood D y Thurston CF (1993). Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 139:1209-1218.
- Perry M (1997). *The handbook of brewery effluent*. Brewery Effluent Services. South Africa, March.
- Pick E y Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for a measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Meth.* 38: 161-170.
- Pickard MA y Westlake DW (1970). Fungal metabolism of flavonoids. Purification, properties, and substrate specificity of an inducible laccase from *Polyporus versicolor* PRL 572. *Can. J. Biochem.* 48:1351-8.
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R y Vazquez-Duhalt R (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3805-3809
- Piontek M, Hagedorn J, Hollenberg CP, Gellissen G y Strasser AWM (1998). Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:331-338.
- Piperidou C, Chaidou C, Stalikas C, Soulti K, Pilidis G y Balis C (2000). Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *J. Agric. Food Chem.* 48:1941-1948.
- Pointing SB (2001). Feasibility of bioremediation by the white-rot fungi. *Arch. Microbiol. Biotechnol.* 57:20-33.
- Popp JI y Kirk TK (1991). Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by Mn³⁺. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:145-148.

- Pouwels AD, Eijkel GB y Boon JJ (1989). Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 14: 237-280.
- Prillinger H y Esser K (1975). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina* XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol. Gen. Genet.* 156:333-345.
- Punt PJ, Biezen van N, Conesa A, Albers A, Mangnus J y Hondel van den C (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20:200-206.
- Ralph J y Hatfield RD (1991). Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1426-1437.
- Ramos-Cormenzana A (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. En: Seville-Spain, FAO (Ed.), International Symposium on "Olive by-products valorization", UN Development Programme, pp. 19-40.
- Ramos-Cormenzana A, Juarez-Jimenez A y García-Pareja MP (1996). Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 38:283-290.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM y Goffner D (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases a divergent gene family in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259:485-495.
- Rayner ADM y Boddy L (1988). *Fungal Decomposition of Wood: Its Biology and Ecology*. Wiley, New York, pp 587.
- Record E, Punt PJ, Chamkha M, Labat M, Hondel van den J y Asther M (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 269:602-609.
- Reddy CA (1993). An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biotechnol.* 30:91-107.
- Reddy CA y D'Souza TM (1994). Physiology and Molecular Biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:137-152.
- Reed JD (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Animal Sci.* 73:1516-1528.
- Reid ID (1979). The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Can. J. Bot.* 57:2050-2058.
- Reid ID y Seifer KA (1982). Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white-rot fungi. *Can. J. Bot.* 60:252-269.
- Reinhammar B (1984). Laccase, pp. 1-35. En: *Copper proteins and copper enzymes*. Vol.3, Lontie L. (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Reinhammar B y Malstrom BG (1981). "Blue" Copper-containing oxidases. En: *Copper proteins (metal ions in biology)* (vol. 3). T.G. Spiro New York: John Wiley and Sons (eds.) pp 109-149.
- Reyes P, Pickard MA y Vazquez-Duhalt R (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* 21:875-880.
- Rios S y Eyzaguirre J (1992). Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:667-669.
- Robinson T, Chandran B y Nigam P (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorisation of textile dyes. *Enz. Microb. Technol.* 29:575-579.
- Robles A, Lucas R, de Cienfuegos AG y Galvez A (2000). Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enz. Microb. Technol.* 26:484-490.
- Rodakiewicz-Nowak J (2000). Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics Catal.* 11:419-434.
- Rodríguez A, Carnicero A, Perestelo F, Fuente G de la, Milstein O y Falcón MA. (1994). Effect of *Penicillium chrysogenum* on lignin transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2971-2976.
- Rodríguez E, Pickard MA y Vazquez-Duhalt R (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32.
- Romanos MA, Scorer CA y Clare JJ (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* 8:423-488.
- Ros J L (1998). Los compuestos fenólicos. *Cerveza y Malta*. XXXVI (2), 138:31-36.
- Rösch R. (1965) Über die Funktion der Phenoloxidasen holzabbauender Pilze. *Holz und Organismen*. 12:173-185.
- Rossi M, Giovanelli G, Cantarelli C y Brenna O (1988). Effects of laccase and other enzymes on barley wort phenolics as a possible treatment to prevent haze in beer. *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols*. 14:85-88.

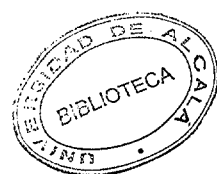
- Rothschild N, Levkowitz A, Hadar Y y Dosoretz CG (1999). Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 483-488.
- Roy-Arcand L y Archibald FS (1991). Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enz. Microb. Technol.* 13:194-203.
- Rozzi A, Passino R y Limoni M (1989). Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactor. *Proc. Biochem.* 4:68-74.
- Ruiz Dueñas FJ, Martínez MJ y Martínez AT (1999). Molecular characterization of a novel peroxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31: 223-235.
- Ruiz JC, de la Rubia T, Pérez J y López JM (2002). Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidio-alba*. *FEMS Microbiol. Letters.* 212:41-45.
- Russell C, Mawson J y Yu PL (1991). Production of recombinant products in yeasts: a review. *Aust. J. Biotechnol.* 5:48-55.
- Rüttimann-Johnson C, Salas L, Vicuña R y Kirk TK (1993). Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispura*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1792-1797.
- Saloheimo M y Niku-Paavola ML (1991). Heterologous production of a lignolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology.* 9:987-990.
- Saloheimo M, Barajas V, Niku-Paavola M-L y Knowles JKC (1989). A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene.* 85:343-351.
- Saloheimo M, Niku-Paavola M-L y Knowles JKC (1991). Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *J. Gen. Microbiol.* 137:1537-1544.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sanchez-Ferrer A, Rodríguez-Lopez JN, García-Canovas F y García-Carmona F (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247:1-11.
- Sandhu DK y Arora DS (1984). Laccase production by *Polyporus versicolor* on different substrates. *Acta Biotechnol.* 4:49-57.
- Sanjust E, Pompei R, Rescigno A, Rinaldi A y Ballero M (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 31:223-235.
- Sato Y, Wuli B, Sederoff R y Whetten R (2001). Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* 114:147-155.
- Savory JG (1954). Breakdown of timber by *Ascomycetes* and *Fungi Imperfecti*. *Ann. Appl. Biology.* 41:336-347.
- Saxena RK, Sharmila P y Singh VP (1996). Microbial degradation of tannins. En: Biotransformations: Microbial Degradation of Health Risk Compounds. Singh, V.P (ed). pp. 259-270. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Sayadi S y Ellouz R (1992). Decolourization of olive oil mill waste waters by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:813-817.
- Sayadi S y Ellouz R (1995). Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill waste waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1098-1103.
- Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 30:3875-3883.
- Scheel T, Höfer M, Ludwig S y Hölker U (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:686-691.
- Scheibner K, Hofrichter M, Herre A, Michels J y Fritsche W (1997). Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:452-457.
- Scherer M y Fischer R (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 170: 78-84.
- Schiestl RH y Gietz RD (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acid as carrier. *Curr. Genet.* 16:339-346.
- Schulten H-R y Schnitzer M (1993). A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften.* 80: 29-30.
- Sethuraman A, Akin DE, Eisele JG y Eriksson K-EL (1998). Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispura* and *Cyathus stercoreus*. *Can. J. Microbiol.* 44:872-885.

- Shuttleworth KL, Postie L y Bollag JM (1986). Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.* 32: 86-89.
- Sidjanski S, Mathews GV y Vanderberg JP (1997). Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J. Parasitol.* 83:686-691.
- Singh AP y Butcher JA (1991). Bacterial degradation of wood cells: a review of degradation patterns. *J. Instit. Wood Sci.* 12:143-157.
- Singleton VL y Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Smith N, Shnyreva A, Wood DA y Thurston CS (1998). Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* y *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology.* 144:1063-1069.
- Smith RA, Duncan MJ y Moir DT (1985). Heterologous protein secretion from yeast. *Science.* 229:1219-1224.
- Soden DM y Dobson ADW (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology.* 147:1755-1763.
- Soden DM, O'Callaghan J y Dobson ADW (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology.* 148:4003-4014.
- Soest van PJ (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. Pp. 198-203. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Sogawa H (1973). Report of the Research Laboratories of the Kirin Brewery Co. Ltd, 1973. 16:29.
- Solomon EI, Sundaram UM y Machonkin TE (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2563-2605.
- Srebotnik W, Jensen Jr KA y Hammel KW (1994). Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12794-12797.
- Srinivasan C, D'Souza TM, Boominathan K y Reddy CA (1995). Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4274- 4277.
- Stafford HA y Cheng TY (1980). The procyanidins of Douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons. *Phytochemistry.* 19:131-135.
- Standard methods for the examination of water and waste-water (17th edn.) (1989). Clesceri LS, Greenberg AE y Trusel RR (eds.). American Public Health Association: Washington, DC.
- Stankiewicz BA, Hutchins JC, Thomson R, Briggs DEG y Evershed RP (1997). Assessment of bog-body tissue preservation by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11: 1884-1890.
- Sutherland GRJ, Haselbach J y Aust SD (1997). Biodegradation of cross-linked acrylic polymers by white-rot fungus. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 4:16-20.
- Swain T y Hillis WE (1959). Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63.
- Swamy J y Ramsay JA (1999). The evaluation of white-rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enz. Microb. Technol.* 24:130-137.
- Swinkels BW, van Ooyen AJJ y Bonekamp FJ (1993). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *A. Leeuwenh.* 64:187-201.
- Talbots PHB (1971). Principles of fungal taxonomy. ST. Martin's Press, New York.
- Téllez A (2002). Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la lacasa producida por *Heterobasidion annosum* (Fr.:Fr.) Bref. (Estado conidial=*Spiniger meineckellus* (A. J. Olsen) Stalpers). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, Madrid, España.
- Téllez A, Carbajo JM y González AE (2001). Estudio comparativo de la degradación de colorantes azo y polimetilsulfónicos por 3 hongos basidiomicetos. V Congreso Nacional de Micología, Cáceres, España.
- Tello M, Corsini G, Larrondo L, Salas L, Lobos S y Vicuña R (2000). Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1490:137-144.
- Temp U, Zierold U y Eggert C (1999). Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Gene.* 236:169-177.
- Terrón MC, Fidalgo ML, González AE, Almendros G y Galletti GC (1993a). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of wheat straw fractions obtained by alkaline treatments used in pulping processes. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 27: 57-71.

- Terrón MC, Martín C, Manzanares P, Galletti GC y González AE (1993b). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of lignin from paper-industry effluents decolorized by *Trametes versicolor*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:659-661.
- Terrón MC, Fidalgo ML, Galletti G y González AE (1995). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of milled wood lignin of two Chilean woods naturally decayed by *Ganoderma australe*, *Phlebia chrysocrea* and a brown-rot fungus. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 33:61-75.
- Terrón MC, Fidalgo ML, Galletti GC y González AE (1996). Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Researches. Srebotnik E, Messner K. (eds.) Vienna, Austria: Facultas-Univ.-Verl.
- Terrón MC, González T, Carbajo JM, Yagüe S, Arana-Cuenca A, Téllez A, Dobson ADW y González AE (2004). Structural closed-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. 1-62. *Fungal Genet. Biology.* (En prensa).
- Tezuka K, Hayashi M, Ishikara H, Onozaki K, Nishimura M y Takahashi N (1993). Occurrence of heterogeneity on N-linked oligosaccharides attached to sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) laccase of excretion. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29:395-402.
- Thomas DR, Carswell KS y Georgiou G (1992). Mineralization of biphenyl and PCBs by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1395-1402.
- Thurston CF (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140:19-26.
- Tien M y Kirk TK (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science.* 221:661-663.
- Tien M y Kirk TK (1984). Lignin-degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique hydrogen peroxide requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:2280-2284.
- Tien M y Tu CPD (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature.* 326:520-523.
- Tinoco R, Pickard MA y Vazquez-Duhalt R (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:331-335.
- Tomati U, Galli E, Dilena G y Buffone R (1991). Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste-water. *Agrochimica.* 35:275-279.
- Trotter PC (1990). Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: A review. Part 1: Tree improvement, pulping and bleaching, and dissolving pulp applications. *Tappi J.* 73:198-204.
- Trueman LJ (1995). Heterologous expression in yeast. *Methods Mol. Biol.* 49:341-54.
- Tsioulpas A, Dimou D, Iconomou D y Aggelis G (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biores. Technol.* 84:251-257.
- Ullah MA, Bedford CT y Evans CS (2000). Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:230-234.
- Valderrama B, Oliver P, Medrano-Soto A y Vazquez-Duhalt R (2003). Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *A. Leeuwenh.* 84:289-99.
- Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G y Hall BD (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature.* 298:347-350.
- Valli K, Brock BJ, Joshi DK y Gold MH (1992). Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:221-228.
- Vinciguerra V, D'Annibale A, Delle Monache G y Sermanni GG (1995). Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*. *Biores. Technol.* 51:221-226.
- Viterbo A, Yagen, B y Mayer AM (1993). Cucurbitacins, 'attack' enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry.* 32:61-65.
- Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, y Schneider P (1995). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 29:395-403.
- Waterman PG y Mole S (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.
- Wegner GH (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 7:279-783.
- Wesenberg D, Kyriakides I y Agathos SN (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22:161-187.
- Westermarck U y Eriksson K-EL (1974). Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chem. Scand. B.* 28:204-208.

- Wettstein D (1993). Genetic engineering and plant breeding, especially cereals. *Food Rev. Int.* 9:411-422.
- White T (1957). Tannins. Their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.* 8:377-379.
- Wilcox WW (1968). Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. U.S. For. Serv. Prod. Lab. Res. Pap. FPL-70
- William F, Boominathan K, Vasudevan N, Gurujeyalakshmi G y Mahadevan A (1986). Microbial degradation of lignin and tannin. *J. Sci. Ind. Res.* (India), 45: 232-243.
- Williamson PR (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176:656-664.
- Wolfenden BS y Willson RL (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*: 805-812.
- Wood DA (1980a). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117:327-338.
- Wood DA (1980b). Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117:339-345.
- Wosilait WD, Nason A y Terrell AJ (1954). Pyridine nucleotide-quinone reductase. *J. Biol. Chem.* 206:271-282
- Xu F (1996). Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry.* 35:7608-7614.
- Xu F (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. *En: The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation.* Flickinger MC, Drew SW, (eds). New York: Wiley; pp. 1445-554.
- Yagüe S, Terrón MC, González T, Zapico E, Bocchini P, Galletti GC y González AE (2000). Biotreatment of a tannin-rich beer-factory wastewater with the white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 14:905-910.
- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS y Varfolomeyev SD (1994). Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49:257-280.
- Yasuchi K, Yukio K y Yukiko T (1990). DNA for expression and secretion. European patent EP 0 388 166 A1.
- Yaver DS y Golightly EJ (1996). Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene.* 181:95-102.
- Yaver DS, Overjero MDC, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bervauer S, Brown SH y Kauppinen S (1999). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4943-4948.
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K y Dalbøge H (1996). Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:834-841.
- Yesilada O, Sik S y Sam M (1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia troglia*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:37-42.
- Yoshida H (1893). Chemistry of lacquer (*Urubi*). *J. Chem. Soc.* 43:472-486.
- Youn HD, Kim KJ, Maeng JS, Han YH, Jeong IB, Jeong G, Kang SO y Hah YC (1995). Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology.* 141:393-8.
- Zabel RA y Morrell JJ (1992). Wood Microbiology. Decay and its Prevention. Academic Press, Orlando, pp 476.
- Zadrazil F (1987). White-rot fungi and mushrooms grown on cereal straw: aim of the process, final products, scope for the future, pp. 55-62. *En: Degradation of lignocellulosics in ruminants and in industrial processes.* Van der Meer, JM Rijkens, BA y Ferranti, MP (eds). Elsevier Applied Science, London, NewYork.
- Zadrazil F, Grinbergs J y González A (1982). "Palo podrido" decomposed wood used as feed. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15:167-171.
- Zapico EJ (1999). Estudios fisiológicos y moleculares de la expresión de lacasa de *Coriolopsis gallica* y su aplicación a la decoloración de efluentes industriales. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá. Madrid, España.

- Zhang YZ, Reddy CA y Rasooly A (1991).** Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: Sequence analysis of the LIP6 gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene*. 97:191-198.
- Zhao J y Kwan HS (1999).** Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4908-4913.



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
SERVICIO DE POSTGRADO

DILIGENCIA PARA HACER CONSTAR QUE EL
PRESENTE EJEMPLAR DE LA TESIS PRESENTADA
POR D^{ÑA} SOLANA YAQUE PLAZA
CONSTA DE 184 PAGINAS Y HA SIDO ENTREGADA
CON FECHA 29 de ABRIL de 2004
A EFECTOS DE DEPOSITO DE TESIS.

EL FUNCIONARIO,

Manzo del Mero

Reunido el Tribunal que suscribe en
el día de la fecha acordó otorgar
a la presente Tesis Doctoral la
calificación de *Sobresaliente*
Cum Laude

Alcalá de Henares, 9 de Julio de 2004

M. José Martínez



M. del Carmen
Miguel Ángel Falcón Pensabris

M. del B. L.
M^{te} Fd2 Lobato

Maria
Larman
Terrón

M^{te} del Carmen Terrón.